الجزء
الثانى

علم
البكتيرات

التمارين المعملية الأساسية

دكتور مصطفى كمال أبو الدهب
دكتور حسين محمد الكشير
دكتور سيد أحمد القزاز
دكتورة عالية عبد الباقى شعيب



دار المعارف

علـــــم
البكتيرات

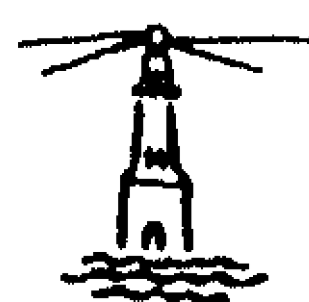
التمارين المعملية الأساسية

الجزء الثانى

دكتـــور مصطفى كمال أبو الدهب
دكتـــور حسيـــن محمد الكشـــير
دكتـــور سيـــد أحمـــد الـــقزاز
دكتورة عالية عبد الباقـى شعيب

قسم أمراض النبات - كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

الطبعة الثانية



دار المعارف

بطاقة الفهرسة
إعداد الهيئة المصرية العامة لدار الكتب والوثائق القومية
إدارة الشئون الفنية

أبو الدهب ، مصطفى كمال .
علم البكتيرات : التمارين المعملية الأساسية .
مصطفى كمال أبو الدهب .... (وآخ) .
ـ ط ٢ . ـ القاهرة : دار المعارف ، ٢٠١١ .
مج ٢ ؛ ٢٤ سم .
تدمك : ٧ ـ ٧٥٣٢ ـ ٢ ـ ٠ ـ ٩٧٧ ـ ٩٧٨ .
١ ـ البكتريا .
أ ـ العنوان .

ديوى ٥٨٩,٩

رقم الإيداع ٧٢٧٠ / ٢٠١١   ١/ ٢٠١١ / ٢

تنفيذ المتن والغلاف
بقطاع نظم وتكنولوجيا المعلومات
دار المعارف

الناشر : دار المعارف ـ ١١١٩ كورنيش النيل ـ القاهرة ـ ج . م . ع .
هاتف: ٢٥٧٧٧٠٧٧ ـ فاكس : ٢٥٧٤٤٩٩٩ E-mail: maaref@idsc.net.eg

بسم الله الرحمن الرحيم

مقدمة

اشتمل هذا الكتيب على معظم التمارين الأساسية الضرورية للتدريب المعملى لدارسى علم البكتيرات فى مجالاته المختلفة وذلك إيماناً منا بأن الدراسات المعملية هى الوسيلة الوحيدة للتوسع فى البحث العلمى والذى يعتبر بدوره المصدر الرئيسى للإضافات العلمية الجديدة لفروع العلم المختلفة ٠

ولاشك أن الإكتشافات العلمية المتنوعة والتى أفادت البشرية فى شتى نواحى الحياه قد جاءت على أيدى من تدربوا تدريباً عملياً جيداً على أسس سليمة واكتسبوا بذلك خبرة أهلتهم للإستمرار فى البحث والتنقيب حتى وصلوا إلى ما وصلوا إليه ٠

وقد راعينا أن نبين الأسس النظرية وراء كل تمرين قبل سرد خطوات العمل فيه مع مراعاة الإمكانات المتاحة فى معظم معامل البكتيرات فى الجامعات المصرية والعربية٠ كما أدرجنا بعض التمارين العملية فى المجالات التطبيقيه المختلفة لهذا العلم٠

والله نسأل أن يكون هذا الكتيب مؤدياً للغرض الذى نشر من أجله وهو ولى التوفيق ٠

المؤلفون

الفهرس

الصفحة

الصفحة

الصفحة

الصفحة

الصفحة

الصفحة

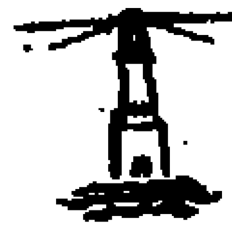
الصفحة

للمؤلفين

علم البكتيرات

الجزء الأول

دكتور مصطفى كمال أبو الذهب
دكتور حسين محمد الكشير
دكتور سيد أحمد القزاز
دكتورة عالية عبد الباقي شعيب



دار المعارف

تعليمات عامة

لما كان الطالب المقدم على التدريب العملي سيتعامل مع كائنات حية غير مرئية لعينه مجردة فكان عليه أن يتبع مجموعة من الإحتياطات التي قد تكون جديدة عليه ليس فقط للحصول على المران الكافي بل أيضاً لحماية نفسه وحماية الآخرين من أخطار هذه الكائنات٠ فعلى الدارس أن يفترض أن كل البكتيرات التي سيتعامل معها ضارة ومسببة أمراض للإنسان ولو أن معظمها ليس كذلك٠

وفيما يلي بعض التعليمات العامة للدراسات المعملية :-

١- يجب إرتداء معطف معملي نظيف أثناء العمل بالمعمل وهذا لا يحمي فقط ملابسك من التلوث المتوقع من البكتيرات بل يحميها أيضاً من التلطخ بالصبغات التي تستعمل يومياً٠ وعند الإنتهاء من العمل يخلع المعطف ويحفظ في مكان آمن٠

٢- يجب ترك الأمتعة الخاصة والكتب غير اللازمة للدراسة بالمعمل في المكان المخصص لذلك خارج المعمل٠

٣- قبل بدء العمل يجب تنظيف سطح منضدة العمل جيداً بمحلول مطهر يوفر لك بالمعمل، وهذا سوف يقلل من فرص التلوث لمزارع البكتيرات التي تتعامل معها٠ ولكي تؤدي خدمة للدارس الذي سيعمل في مكانك بعد مغادرتك ، أعد تنظيف سطح المنضدة بعد إنتهاءك من العمل بنفس المطهر٠

٤- يراعى أن تقلل مساحة المنضدة التي تعمل عليها وعدم زحمها بالأدوات وما لا يحتاج إليه مثل الكتب والشنط وغيرها٠

٥ - ممنوع تناول الأطعمة من أي نوع وكذلك ممنوع التدخين ويجب أن تتعود أن تبعد يديك بقدر الإمكان عن وجهك وخاصة عينيك٠ وأن لا تلصق البطاقات المصمغة بلسانك بل يجب أن تستعمل الماء في ذلك٠

٦- ضع المزارع القديمة والمستغنى عنهاعلى حامل خاص بذلك حتى يمكن التخلص منها بالتعقيم بالأوتوكلاف - ولا يحتفظ بها على الإطلاق٠

٧- على الدارس أن يعيد كل شيىء لمكانه الذي وجده عليه عند بدء التمرين٠

٨ - إذا كسرت أنابيب أو دوارق بها مزارع بكتيرات ونثرت على الأرض يجب إبلاغ المسئولين عن المعمل فوراًحتي يقوموا بالإجراءات التعقيمية اللازمه٠

الدراسات المجهرية

Microscopy

هناك أنواع عديدة من المجاهروكل نوع له إمكاناته وحدوده وليس هناك مجهراً يؤدى كل الأغراض بكفاءة عالية• والأنواع الأساسية هى مجاهر الحقل المضىء، وتباين.الأطوار والمجاهر الفلورسنتية والمجاهر الإلكترونية•

وحيث أن مجهر الحقل المضىء ومجهر تباين الأطوار هى أكثر المجاهر إستعمالاً فى مجال علم البكتيرات لذا فقد أدرجنا بهذا الكتيب تمارين خاصة بهما والأسس النظرية لإستعمالاتها فى فحص وقياس أحجام الخلايا•

المجهر ذو الحقل المضىء

إن المجهر الذى يسمح بمرور الآشعة الضوئية خلاله لتصل إلى العين دون أن يتعرض لها أى جسم معتم فى المكثف الخاص به يعرف بالمجهر ذو الحقل المضىء• وهذا المجهر هو المستعمل بكثرة بواسطة دارسى علوم الحياة على إختلافها وهو أول أنواع المجاهر التى أستعملت بالمعامل البيولوجية وكل أنواع هذا المجهر تشترك فى مكوناتها ولكنها قد تختلف فقط فى ميكانيكية تشغيلها•

الإضاءة

معظم المجاهر الحديثة مزودة بمصباح كهربائى يزودها بالضوء اللازم،والمجاهر القديمة تحتوى على مرآة تحت الحقل المجهرى لعكس الضوء الصادر من آشعة الشمس أو من مصباح كهربائى متنقل يوضع أمام المرآة•

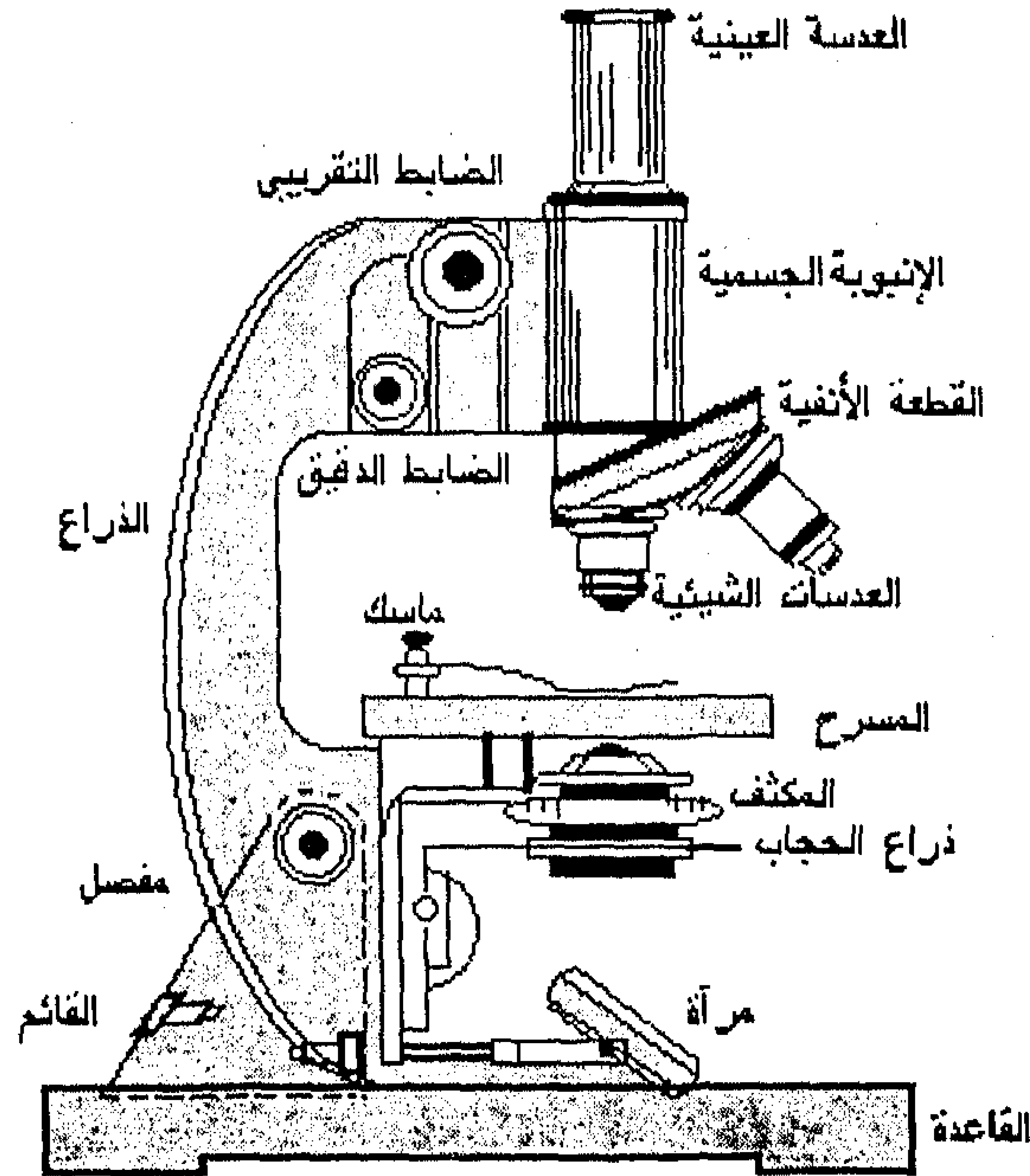
وعادة تكون المرآة ذات سطح مستوى من جانب وآخر مقعر من الجانب الآخر • والسطح المستوى يستعمل فقط إذا كان المجهر يمتلك مكثف ضوئى والعكس صحيح إذا لم يكن للمجهر مكثف• والسبب فى ذلك أن المكثف الضوئى الملحق بالميكروسكوب يستقبل الآشعة المتوازية التى توفرها المرآة المستوية السطح أما عند غياب المكثف فإن إستعمال المرآة المقعرة يركز الضوء على الشريحة المحتوية على المادة المفحوصة• إلا أنه فى المجهر ذو الإضاءة الذاتية والذى ليس له مرآة فإن المصباح الملحق به يمكنه أن يوفر مستويات مختلفة من الإضاءة عن طريق تغير درجة الفولت ويراعى أن كمية الضوء المستعملة تكون عادة قليلة حيث أن الصمام الذى يستعمل ذو قوة ٤ فولت فقط وهذا يؤدى الغرض بكفاءة، يمكنه أن يستمر مدة طويلة إذا ما روعى إستعمال درجة منخفضة من الفولت• وعند إستعمال المجهر ذو الحقل المضىء يفضل فتح الحجاب diaphragm على آخره قبل زيادة كمية الضوء•

مكونات المجهر ذو الحقل المضىء

قبل أن نذكر طريقة تشغيل المجهر يجب أن نتعرف أولاً على أجزاءه المختلفة ففى الشكل (١) يبين مجهر ضوئى مركب يتركب من الآتى الذراع Arm والقاعدة Base ومرآه يمكن استبدالها بمصدر كهربى•واللمبة فى هذا المجهر لها يد متحرك لتتحكم فى شده الإضاءه ومزوده بمكان تسمح بوضع أى نوع من الفلاتر التى تنقى الضوء الصادر من اللمبة وتقلل من شدة الإضاءة وهذه الفلاتر يجب أن تزال تماماً إذا مااستعمل المجهر للحصول على أقصى تكبير له•

ونعود مرة أخرى لسرد باقى أجزاء المجهر فنجد المسرح المجهرى Stage وهو المكان الذى توضع فوقه الشريحة•

وهناك مجاهر ذات مسارح ثابتة وأخرى ذات مسارح متحركة ميكانيكياً mechanical stages ذات سطح علوى يسمح بتسكين الشريحة وتثبيتها فى مكانها كما يسمح تحريك المسرح نفسه بما عليه من شريحه فى جميع الإتجاهات بالإستعانة بمفتاحين ملحقين به وهذه المفاتيح إما تكون أسفل المسرح أو أعلاه ٠



شكل (ا) الميكروسكوب الضوئى ـ ميكروسكوب مركب ٠

وتحت المسرح مباشرة نجد مجموعة من العدسات تكون ما يعرف بالمكثف والسابق الإشارة إليه ٠ وهذا المكثف يعمل على تجميع الأشعة الضوئية على سطح الشريحة ٠ ويمكن تحريك المكثف إلى أعلى وإلى أسفل باستعمال المفاتيح الخاصة بذلك الموجودة تحت المسرح أيضاً ٠ وللإستعمال المثالى للمجهر يستحسن أن يكون المكثف فى أقصى إرتفاع له ونادراً ما يضطر الفاحص إلى

خفضه قليلاً لأسفل • وتحت المكثف مباشرة نجد الحجاب diaphragm وهويتحكم فى كمية الضوء التى تمر خلال المكثف وله يد يمكن بواسطتها قفله أو فتحه بالدرجة اللازمة وهو يشبه الحجاب الموجود خلف عدسات كاميرات التصوير الفوتوغرافى•

والعدسات الأولية للمجهر هى الشيئيات Objectives وهى الموجودة على الطرف السفلى من الأنبوبة المجهرية وهى مثبتة بجزء دائرى يتحرك دائرياً أيضاً يعرف بالجزء الأنفى nose piece• وأقصر العدسات تعرف بالقوة الصغرى Low power objective ويوجد عليها قراءة (10X) وأطول الشيئيات يوجد عليها قراءة (100X) وهذه العدسة تعرف أيضاً بالعدسة الزيتية Oil immersion objective وذلك لأنها تتطلب عند إستعمالها غمرها فى كمية قليلة من نوع معين من الزيت يعرف بزيت السيدر والذى يتميز بمعامل إنكسار (٥١٥٠, ١) وهذا يشابه معامل إنكسار الضوء للزجاج والعدسه الوسطى تعرف بالعدسة الكبرى الجافة high dry objective ومكتوب عليها 40X • وهناك مجاهر تحتوى القطعة الأنفية منهاعلى أكثر من ثلاث شيئيات و ذات قوى تكبير مختلفة• أما العينيات Ocular lenzes فقوتها عادة 10X وأحياناً 15X•

وعلى جانب المجهر نجد مفتاحين دائرين ذات حافة مشرشرة أحدهما كبير ويعرف بالمعدل التقريبى Coarse adjuster والآخر أصغر حجماً يعرف بالمقرب الدقيق fine adjuster وهما يستخدمان لخفض أو رفع الانبوبه المجهريه لإيضاح الصورة المرئية ووضعها فى مكانها البؤرى الواضح foucusing •

طريقة الفحص بالعدسة المغمورة فى الزيت:-

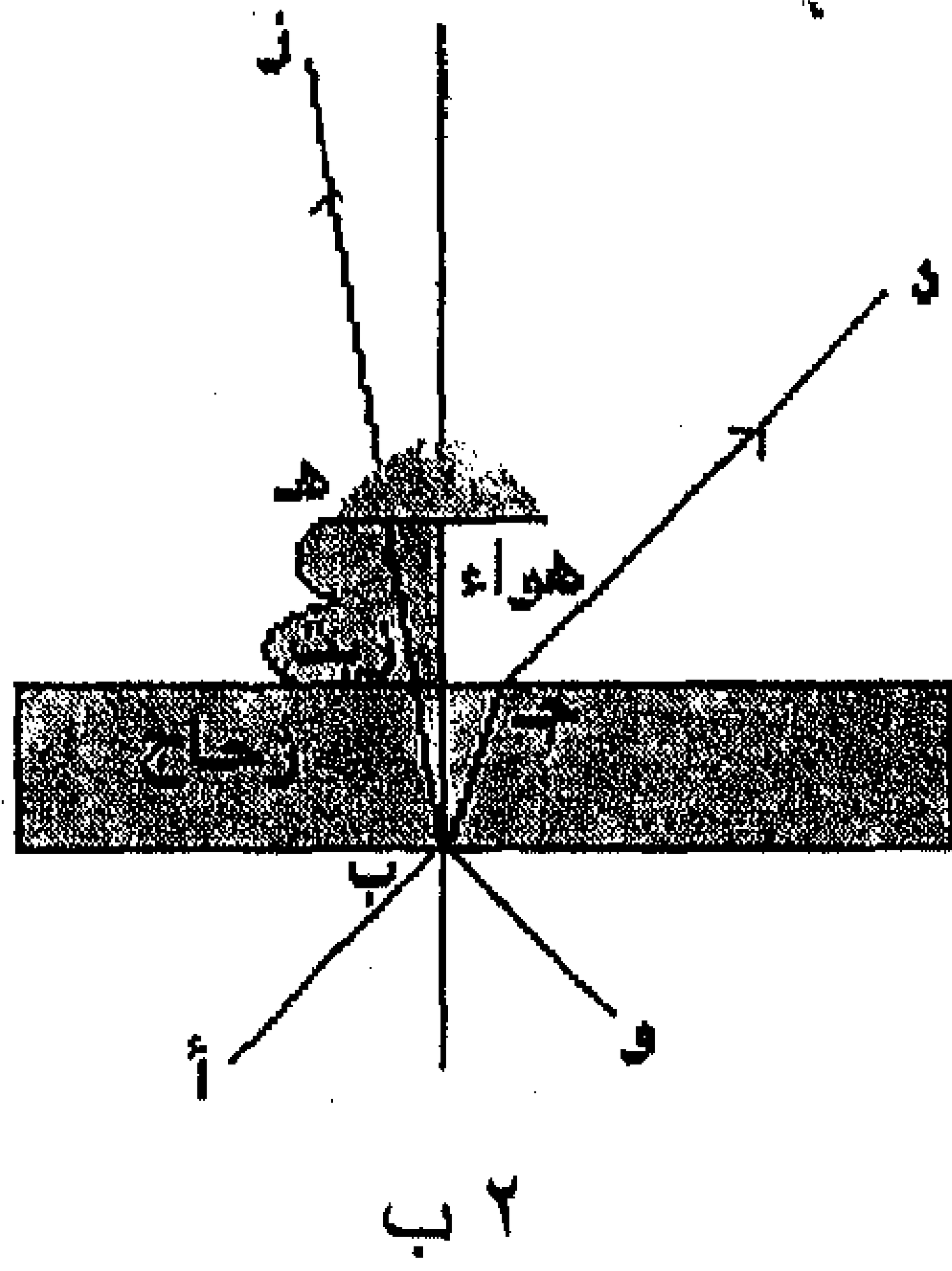
إن كل الدراسات المجهرية البكتيريولوجية وكذلك بعض الدراسات المجهرية لإختبارات الدم تتطلب إستعمال الشيئية المغمورة فى الزيت

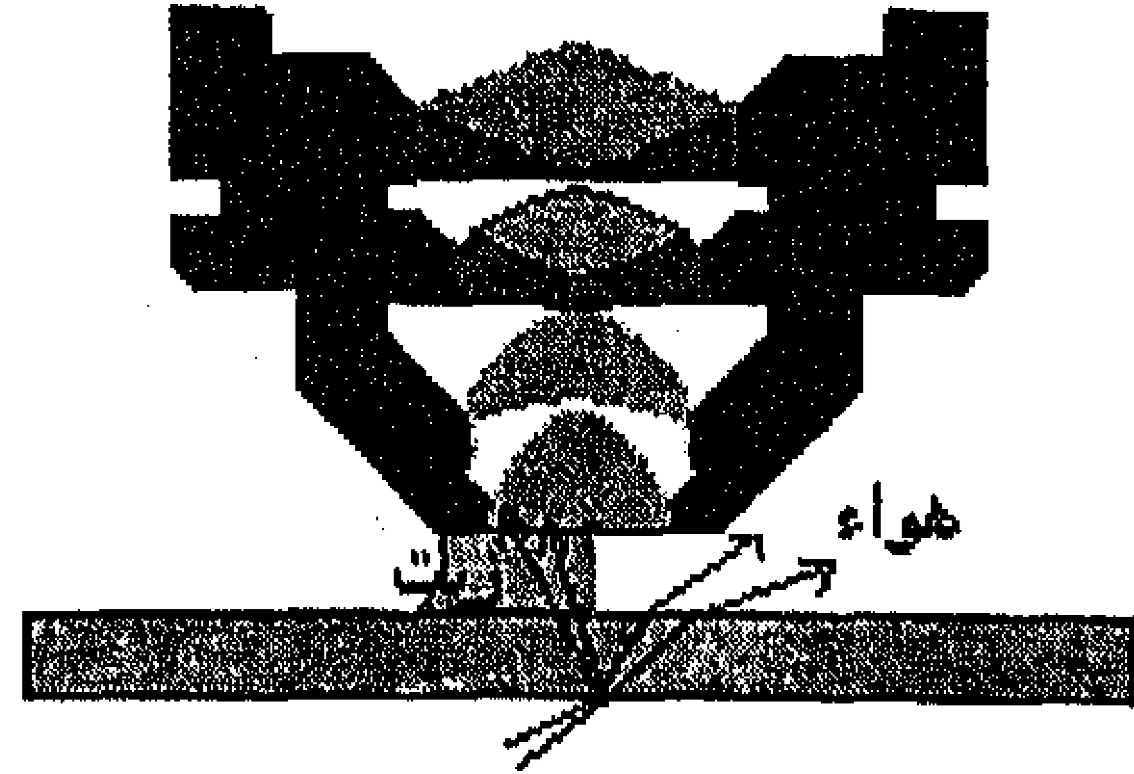
(100X)•والصعوبة في إستعمال هذه العدسة تتمثل في القصر المتناهي لمسافة العمل working distance ـ الخاص بهذه العدسه فهي تعمل وهي قريبة جداً من الشريحة ومتوسط مسافة العمل هذه تصل إلى ١٤, من المليمتر وصغرهذه المسافة ، من مميزات زيادة القدرة الأيضاحية لهذه العدسة علاوه على أنه ضروري لضمان بقاء الزيت ملتصقاً بكل من العدسة والشريحة•وفائدة وضع نقطة الزيت فوق الشريحة هو زيادة قيمة الفتحة العددية للشريحة كما سيأتي إيضاحه فيما بعد•

يلاحظ في شكل (٢أ،ب) أن وجود الزيت ذو معامل الإنكسار المساوى لمعامل إنكسار الزجاج يعمل على دخول أكبر كمية من الآشعةالضوئية داخل فتحه العدسه الضيق ولا يفقد منه شيئاً• ولإستعمال هذه الطريقه يوضع نقطه من زيت السيدر فوق الشريحه ثم نبدأ الفحص أولاً بإستعمال الشيئية الصغرى ونحاول أن نضع الجسم المرئى في مجال بؤرتها ثم نحرك القطعه الانفيه إلى الشيئية الكبرى الجافة ويضبط مجال بؤرتها أيضاً ثم ننتقل بعد ذلك إلى العدسة الزيتية و التى ستنغمر في الزيت لصغر مسافه عملها ـ يراعى عدم تلويث العدسات الأخرى بالزيت وأحياناً يمكن للباحث المدرب أن يعمل بالعدسة الزيتية مباشرة دون التدرج إليها خلال الشيئيات الأخرى•

التكبير: Magnification

هو العلاقة بين طول أى جزء من الصورة وطول الجزء المماثل له في الجسم المرئى عندما تكون الصوره والجسم في أقرب نقطة لوضوح الرؤية لعين الإنسان• إن الإنبوبة الميكروسكوبيه تكون عادة ذات طول قياسي هو ١٦٠سم إلا أنة في بعض الميكروسكوبات يمكن زيادة طول الإنبوبة عن القيمة المذكورة لغرض زيادة التكبير وتعرف هذة الميكروسكوبات باشتمالها على أنبوبة للسحب Draw tube•





٢ ب

٢ أ

شكل ٢ أ ، ب :رسم تخطيطى يبين مسار الأشعة خلال عدسة جافة (الى اليمين) وخلال عدسة زيتية (الى اليسار) لاحظ إنكسار الشعاع الضوئى المائل أ ب جـ د خلال مروره من زجاج الشريحة الى الهواء مع مقارنتة بالشعاع و ب هـ ز الذى يمر الى فتحة العدسة الزيتية بدون حدوث إنكسار خلال زيت السيدر ٠

والتكبير النهائى للميكروسكوب كما هو معروف هو حاصل ضرب تكبير الشيئية فى تكبير العينية إذا ما ثبت طول الإنبوبة الميكروسكوبية٠ ويلاحظ أنه فى بعض الميكروسكوبات قد تكون الإنبوبة قطعة واحه ثابتـه أو قد يكون بداخلها أنبوب آخر هو أنبوب السحب يمكن سحبه لأعلى وبتحريكة يمكن تغير المسافة بين العينية والشيئية فإذا زاد طول الإنبوبة عن ١٦٠ مم حتى يصل الى ٢٠٠ مم مثلا فإن قوة تكبير الشيئية تزداد بمعدل ١٦٠/٤٠ أى أنها تزيد الى واحد وربع مرة عما كانت عليه وبالتالى يزداد التكبير الكلى ويرمز الى عدد مرات تكبير العدسة للجسم المرئى بعلامة (×) ولكل شيئية أو عينية قوة تكبيرخاصة بها تكون مرقومة على سطحها الخارجى بجانب العلامةالمذكورة٠

وتتراوح قوة تكبير الشيئيات بين ٢,٥ × ، ١٠٠× ، وفى العينيات بين ٤× و ٣٥× ٠

ويلاحظ أنه يمكن زيادة درجة التكبير Degree of magnification بإستعمال عينيات أو شيئيات متزايدة القوة أو كما سبق ذكره بزيادة طول الإنبوبة ، وبالرغم من أن قوة التكبير للميكروسكوب تزداد بهذة الطريقة إلا أن درجة التفصيل (قوة التمييز) Resolution التى يمكن مشاهدتها لا تتغير حيث أنها تتحدد بطول موجة الضوء المستعمل والعدسة الشيئية المستعملة ٠

طول الموجة الضوئية :

تختلف أطوال الموجات الضوئية المكونة للمجال الضوئى المرئى وهو المجال المستعمل فى الميكروسكوب الضوئى والتى تتراوح بين (٤٠٠٠) أ (A^0) و(٧٠٠٠) أ٠

أما عند إستعمال موجات يقل طولها عن ذلك فتستعمل ميكروسكوبات أخرى مثل ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسيجية Ultra - violet microscope والذى يستعمل الموجات فوق البنفسيجية التى يتراوح طولها بين ٣٠٠٠ و١٠٠٠ A^0 ، وميكروسكوب أشعة Ray X والذى يستعمل أشعة X التى يتراوح طولها بين ١٠٠ و ١٠ A^0 ، والميكروسكوب الإلكترونى Electron- microscope والذى يستعمل الأشعة الإلكترونية التى طولها ٠,٠١ A^0 أو أقل٠ وعند إستعمال

أ = أنجستروم (A^0) Angstrom

الملليمتر = ١٠ ^{٣} ميكرون (µ)٠

ميكرون (µ) = ١٠ ^{٤} A^0

الأنجستروم = ١٠ $^{-٧}$ من الملليمتر٠

ميكرون (µ) = ١٠ ^{٣} nm نانوميتر٠

ضوء غير مرئـى تلتقط صـورة الجزء المفحـوص علـى لـوح حسـاس يحمـض وتطبع الصوره المتكونة عليه بعد تكبيرها تكبيراً مناسباً ٠

الشيئيات وقوة التفصيل (قوة التمييز) :

الشيئية عبارة عن عدسـة مركبـة (عـد سـتين أو اكـثر) ، وهـى الجـزء الأساسى من الميكروسكوب وتتلخص وظائفها فى الآتى:

١ـ تستقبل الأشعة الضوئية الآتية من أى نقطـة مـن العينـة المفحوصـة وتكون لها صورة كما سبق أن وضحنا ٠

٢ـ التكبير: قد يتعجب الطالب لماذا لاتصمم ميكروسكوبات ضوئية ذات قوة تكبيرية أكبر مما يشاهده فى المعمل؟ والسبب فى ذالك أن المشكلة ليست فى قوة التكبير بل فى قوة التفصيل (قوة التمييز) Resolving power الخاصة بالشيئية أو بمعنى آخر قدرة الشيئية على أن تكون صوراً منفصلـة عـن بعضـها لنقـط أو اجزاء صـغيرة متقاربـة مـن بعضـها بشـكل صـور منفصلـة غـير متراكبـة فـوق بعضهاوهذه الخاصية تحدد التفاصيل البنائية التى يمكن مشاهدتها ميكروسكوبياً ٠

وقوة التفصيـل (قـوة التمييز) هـذه تتحـدد بطـول الموجـة الضوئيـة (λ) وقيمة الفتحة العددية (NA) Numerical aperture للشيئية ، وهذه العلاقة يمكـن التعبير عنها بالمعادلة الاتية :

$$\text{قوة التفصيل(قوة التمييز)} = \frac{\text{طول الموجه الضوئية}}{\text{٢} \times \text{الفتحة العددية}}$$

$$\text{Resolving power} = \frac{\lambda}{2 \times NA}$$

وتقدر الفتحـة العددية NA للعدسة بالمعادلة الاتية :

الفتحة العددية = ن جا θ

$$NA = n \sin \theta$$

حيث أن (n) = معامل انكسار الوسط بين الجسم والشيئية (١,٠ فى حالة الهواء و١,٥ فى حالة زيت السيدر Ceder-wood oil) و جاθ (sin θ) = جيب (جا) نصف زاوية مخروط الضوء التى تملأ مقدمة الشيئية Angle of aperture وهى الزاوية (أ جـ ر) التى تتكون بواسطة أقصى شعاعين من الضوء واللذان يبدآن من النقطة حـ والتى تصل إلى عين الفاحص ٠(شكل ٣)

حيث جا θ = أ ب / أ جـ

شكل ٣: مخروط الأشعة الخارجة من الجسم جـ والتى تملأ مقدمة الشيئية٠

ويلاحظ أن قيمة الفتحة العددية NA لشيئية الميكروسكوب محدودة فأن أقصى قيمة للفتحة العددية للشيئيات الجافة أقل من ١ وللشيئيات المغموسة فى الزيت تكون أكثر قليلاً من الوحدة (١,٢ -١,٤)٠

ومما هو جدير بالذكر إن الطول الموجى للضوء المرئى المستعمل فى الميكروسكوب الضوئى محدود أيضاً فهى تتراوح بين ٤٠٠٠ و ٧٠٠٠ أنجستروم ، وبذلك يظهر أن قوة التفصيل (قوة التمييز) للميكروسكوب الضوئى

محدودة نتيجة لأن قيم الفتحة العددية للشيئيات وطول الموجة الضوئية للضوء المنظور أو المرئى هى قيم محدودة ٠

وعلى ذلك فإنه يلزم لرؤية الاجسام الدقيقة الحجم منفصلة بعضها عن بعض بإستعمال أقل طول موجة ضوئية من الضوء المنظور وشيئية لها أقصى فتحة عددية ممكنة . فمثلاً الشيئية المغموسة فى الزيت لها فتحة عددية قيمتها ١,٢٥ وأن الضوء الأخضر -الذى تكون العين أكثر حساسية له -له طول موجة ٥٠٠٠ أنجستروم أو ٥٠٠ n ٠ وبتطبيق هذه القيم فى معادلة حساب قوة التفصيل (التمييز) :

$$\text{قوة التفصيل (قوة التمييز)} = \frac{٥٠٠}{٢ \times ١,٢٥}$$

= ٢٠٠ nm

=٢,. ميكرون .

=٢٠٠٠ أنجستروم .

ومن ذلك يتضح لنا أن أصغر جسم يمكن تمييزه بوضوح بالميكروسكوب الضوئى يجب أن لا يقل قطره عن ٢,. ميكروناً تقريباً ٠

ويلاحظ أن العين لاتستطيع أن تميز بين أجسام تبعد عن بعضها مسافة تقل عن ٢٠٠ ميكرون (أى ٢,. من المليمتر) ولاتستطيع أن ترى أجساماً يقل قطرها عن ذلك أيضاً ولذلك فإنه يجب تكبير الصورة التى تكونها الشيئية فى المجهر المركب حتى تستطيع أن تراها منفصلة عن بعضها، فمثلاً إذا كانت قوة تفصيل (تمييز) عدسة شيئية ٢, . ميكرون فلكى تستطيع عين الفاحص أن ترى هذا التفصيل يجب أن يكون التكبير الكلى للميكروسكوب١٠٠٠مرة بحيث تكبر مسافة الـ٢,. ميكرون إلى ٢٠٠ ميكرون .

ومما تقدم نعتقد أننا نستطيع الآن أن نقنع من يتساءل لماذا لا تصنع ميكروسكوبات ضوئية ذات قوة تكبيرية أعلى من المتوفر حاليا فإذا فرضنا حدوث ذلك فإن التكبير الناتج لا يصاحبه أى تفصيل (تمييز) ويكون تكبير عديم القيمة من حيث الكشف عن التركيب الدقيق للجسم ويطلق عليه تكبير أجوف Empty magnification وبذلك فإن التكبير والتفصيل مكملان لبعضهما ، فتكبير بدون تمييز هو تكبير أجوف لا يكشف عن تفاصيل جديدة كما أن تمييزاً بدون تكبير كاف لا تستطيع العين أن تراه .

وبالرجوع إلى معادلة قوة التفصيل السابقة يظهر لنا أن قوة التفصيل (التمييز) للعدسة تزداد كلما قصر طول الموجة الضوئية المستعملة، فبينما تكون أصغر مسافة يمكن تمييزها بين جسمين صغيرين منفصلين ومتجاورين يمكن للميكروسكوب الضوئى المركب تمييزها هى مسافة ٢,. ميكرون فإنها تكون مع ميكروسكوب الاشعة فوق البنفسجية =١,. ميكرون وبالميكروسكوب الألكترونى= ١٠٠٠,. ميكرون .

البعد البؤرى المكافىء : Equivalent Focus Length

يقدر لكل عدسة بسيطة بعداً بؤرياً Focal length خاصاً بها ونظراً لأن العدسة الشيئية هى عبارة عن عدسة مركبة تتكون من عدد من العدسات فإنه توجد لها بعداً بؤرياًخاصاً يعبر عنه بالبعد البؤرى المكافىء ، وهو يقدر بالبعد البؤرى النظرى لعدسة بسيطة لها نفس قوة تكبير الشيئية المركبة ، ويقدر البعد البؤرى المكافىء بالمليمتر أو بالبوصة .وعموماً فى حالة تساوى عدستين فى البعد البؤرى فإنه يفضل ذات الفتحة العددية NA المرتفعة على الاخرى ذات الفتحة العددية المنخفضة . وعموماً فإن الشيئية ١٦ مم (أى بعدها البؤرى المكافىء = ١٦ مم) تكون ذات فتحة عددية = ٢٨,. ، والشيئية ٤مم (بعدها

البؤرى المكافىء ٤مم) تكون ذات فتحة عددية =٦٥,. ، والشيئية ٢مم (بعدها البؤرى المكافىء ٢مم) تكون قيمة الفتحة العددية لها ١,٢٥ ،

مسافة الفحص : Working Distance

هى المسافة بين مقدمة الشيئية والسطح العلوى للجسم (فى حالة عدم أستعمال غطاء شريحة) أو المسافة بين مقدمة الشيئية والسطح العلوى لغطاء الشريحة (عند استعمال غطاء الشريحة) . فإذا كان غطاء الشريحة أسمك من مسافة الفحص للشيئية فإن من المستحيل مشاهدة الجسم المغطى متبوئراً In focus وكلما زادت قوة تكبير الشيئية كلما قلت مسافة الفحص ولزم استعمال أغطية للشرائح رقيقة وعادة يكتب سمك غطاء الشريحة الذى يمكن استعماله مع الشيئيات المرتفعة القوة على سطحها المعدنى ،

التمرين الاول

١ ـ افحص اجزاء المجهر التى امامك وتعرف عليها ،

٢ ـ ضع نقطه من زيت السيدر على الشريحه المجهزه التى امامك ،

٣ـ افحص الخلايا بأستعمال العدسه الزيتيه بالطريقه السابق وصفها ،

الدراسات المجهرية بالحقل المظلم

إن هذه الطريقة تمكن من رؤية الأجزاء المفحوصة مضيئه فى حين أن باقى الشريحة تكون مظلمة تماماً ويمكن الحصول على هذا التأثير بتزويد المجهر الضوئى بنوع معين من المكثفات يمكنها توجيه الضوء الصادر من مصدر الإضاءة بعيداً عن الشيئية وأنه لا يصل إلى فتحتها إلا الآشعة التى تصطدم فقط بالأجسام أو الأشياء الموجودة فى وسط متجانس – أى الأجسام المراد فحصها – وبدخول الضوء المبعثر خلال الشيئية يؤدى ذلك إلى ظهور الأجسام العالقة بحالة مضيئة وسط حقل غير مضىء (مظلم) وتتبع هذه الطريقة فى فحص الخلايا غيرالمصبوغة والعالقة فى نقطة من البيئة٠

ويمكن تقليد هذه الطريقة إن لم يتوفر المكثف الخاص بالحقل المظلم بإتباع طريقة الصبغ السالب Negative stain وفى هذه الطريقة تخلط خلايا البكتيرات بمعلق من الفضة الغروية والمعروف بالكلارجول Collargol أو الحبر الصينى China ink أو محلول النيجروسين Nigrosin ويفرد المخلوط على الشريحة بشكل غشاء رقيق ثم يترك ليجف فى الهواء ٠ فإن جزيئات الصبغه سوف تتكدس حول الخلايا البكتيريه التى تظل شفافه واضحه فى وسط أسود اللون من حبيبات الصبغه ٠ وتعرف هذه الطريقه بالصبغ السالب حيث أن الخلايا البكتيريه لاتتخذ أى لون بل أن الوسط المحيط بها هو الذى يتخذ اللون الاسود الداكن ٠

ويمكن بواسطه هذة الطريقه دراسه الشكل الظاهرى للخلايا البكتيريه دون تعريضها لمعاملات حراريه أو كيماويه قد تؤثر على شكلها العام ٠كما أنه بواسطه الصبغ السالب يمكن مشاهده البكتيرات التى يصعب صبغها بالطرق العاديه وخاصه أفراد الجنس Spirocheata ٠

التمرين الثانى

١ـ حضرمزارع حديثة من:

Corynebacterium fascian , Bacillus subtilis, Sarcina lutea , E. coli , Saccharomyces cerevisieae

٢ـ ضع نقطة من معلق النيجروسين على شريحة زجاجية نظيفة٠

٣ـ إلمس النمو البكتيرى على الآجار بالمزرعة المستعملة بواسطة إبـرة التلقيح ذات العقدة المعقمة لتنقل كمية قليلة من النمو ثم إخلطه بواسطة نفس الإبرة بنقطة النيجروسين على الشريحة ثم أنشر المخلوط على الشريحة بشكل غشاء رقيق نسبياً٠

٤ـ أترك الغشاء ليجف تماماً فى الهواء (لاحظ عدم إستخدام الحرارة لتجفيف الغشاء أو لتثبيته إذ أن محلول النجروسين يعمل على لصق الخلايا بالشريحة)٠

٥ـ ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية٠ صف وإرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات الدقيقة٠

الفحص المجهرى بإستعمال الأطوار المتباينة

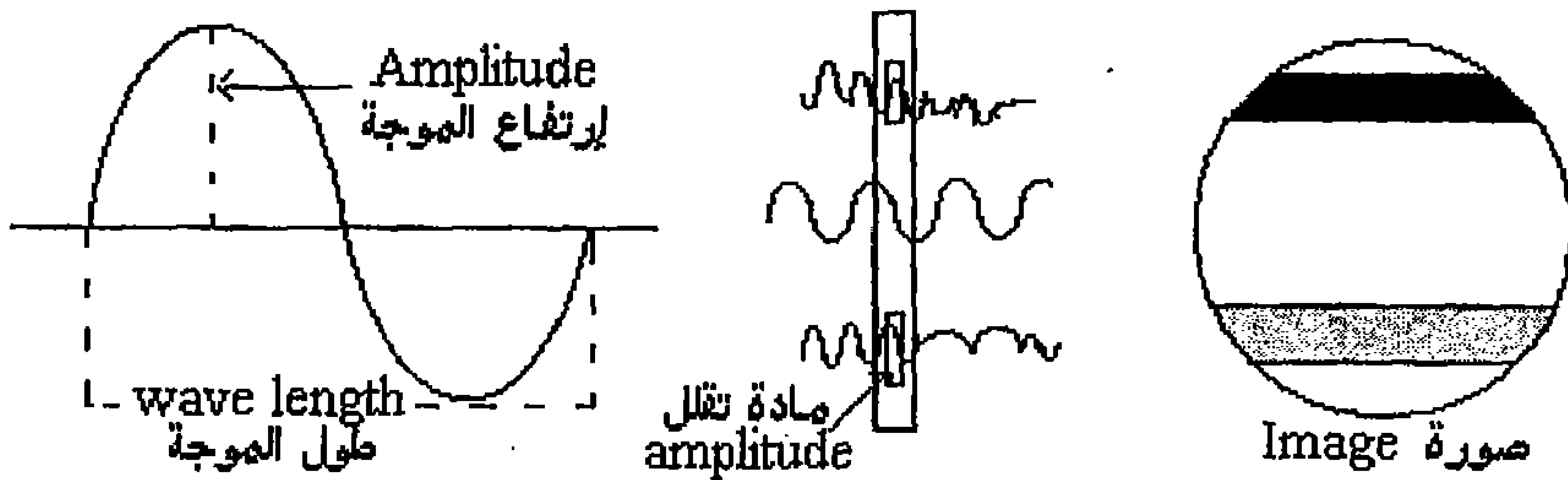
Phase Contrast Microscopy

إن معظم محتويات الخلية وتركيباتها تتميز بشفافيتها وعدم القدرة على تمييز بعضها عن بعض، ولهذا السبب فإن الدراسات السيتولوجية كانت ولازالت تعتمد على دراسة الشرائح المصبوغة بإستعمال المجهر الضوئى، وحيث أن عمليات الصبغ تقتضى قتل الخلايا قبل وأثناء صبغها فمن الواضح أن دراسة مثل هذه التحضيرات المصبوغة ما هى إلا دراسة التركيبات غير طبيعية astifacts وليست حقيقية لذلك فقد فكر العالم الهولندى Frederic Zernike عام ١٩٣٣ فى إيجاد نوع جديد من المجاهر يساعد كثيراً فى دراسة التراكيب الداخلية للخلية الحية وهو مجهر الأطوار المتباينة والذى له المقدرة على زيادة التباين Contrast بين الجزيئات الشفافه بداخل الخلية الحية معتمداً على الإختلافات فى كثافة هذه الجزيئات،

صورة التباين Image contrast

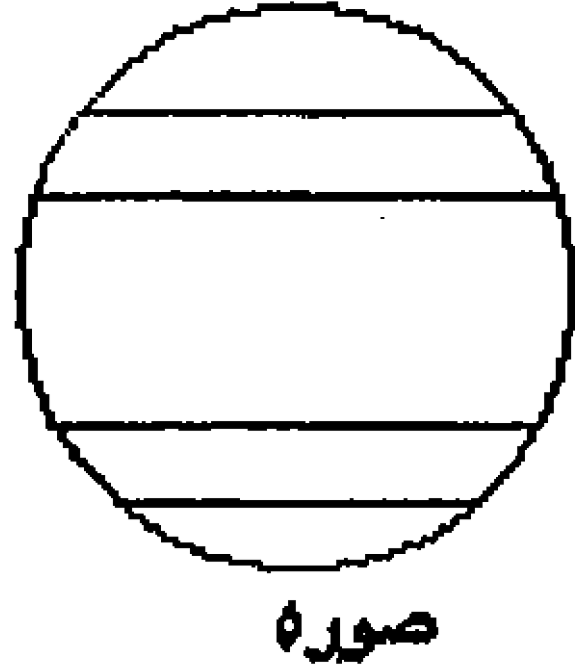
يمكن تقسيم الأشياء التى تشاهد بالمجهر إلى نوعين :-

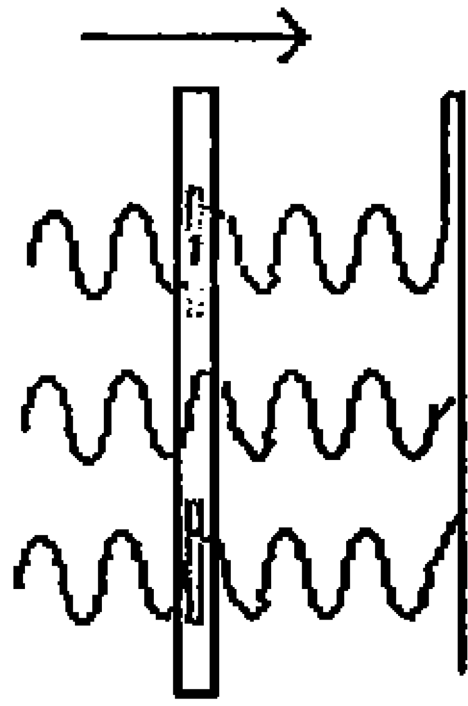
أ- أجزاء ذات كثافة مرتفعة تعرف amplitude objects وهذه تظهر كأنها أجسام غامقة حيث أنها تقلل من كثافة الأشعة الضوئية المارة بها أو الساقطة عليها (شكل ٤) ،



شكل ٤: amplitude objects، إن درجة تقليل إرتفاع الموجه الضوئية amplitude يحدد درجة عتامه الشيء المفحوص بداخل الحقل الميكروسكوبى،

ب ـ أجزاء طورية Phase objects وهى شفافة تماماً حيث أن الآشعة الضوئية تمر خلالها دون أن يحدث لكثافتها أى تغيير (شكل٥) ولما كان بعض الآشعة يمكنها أن تنفذ خلال هذه الأجسام فإن طول موجاتها سوف يتأخر بمعدل الربع وهذا التأخر يعرف بالتأخر التبايني phase shift دون التأثير على كثافة الضوء نفسه – ولما كانت الصبغات تعتبر أجزاء طورية تفتقر إلى التباين والإختلاف إذن فهى لا تستعمل بهذا النوع من الدراسة هذا علاوة على ما سبق أن بيناه بأن عمليات الصبغ تخل أو تشوه التراكيب الطبيعية داخل الخلايا نتيجة للصبغ والتسخين والتثبيت وخلافه٠

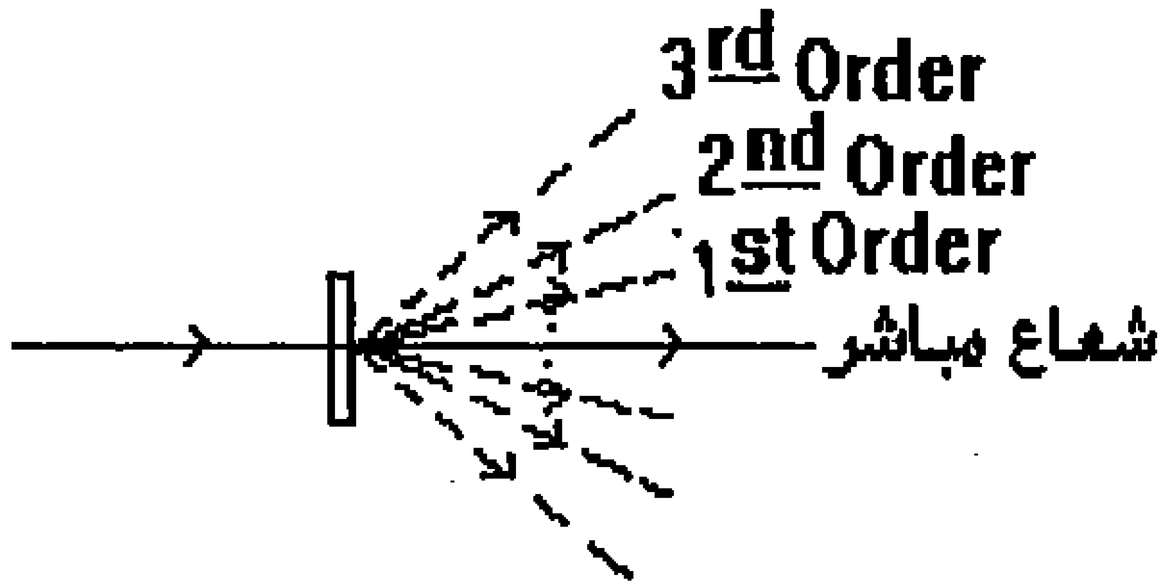




شكل ٥: Phase objects يبين أن تأخر الأشعة بمعدل ربع طول موجتها دون التأثير على أرتفاع الموجه amplitude وهذا يؤدى الى ظهور أجسام شفافة٠

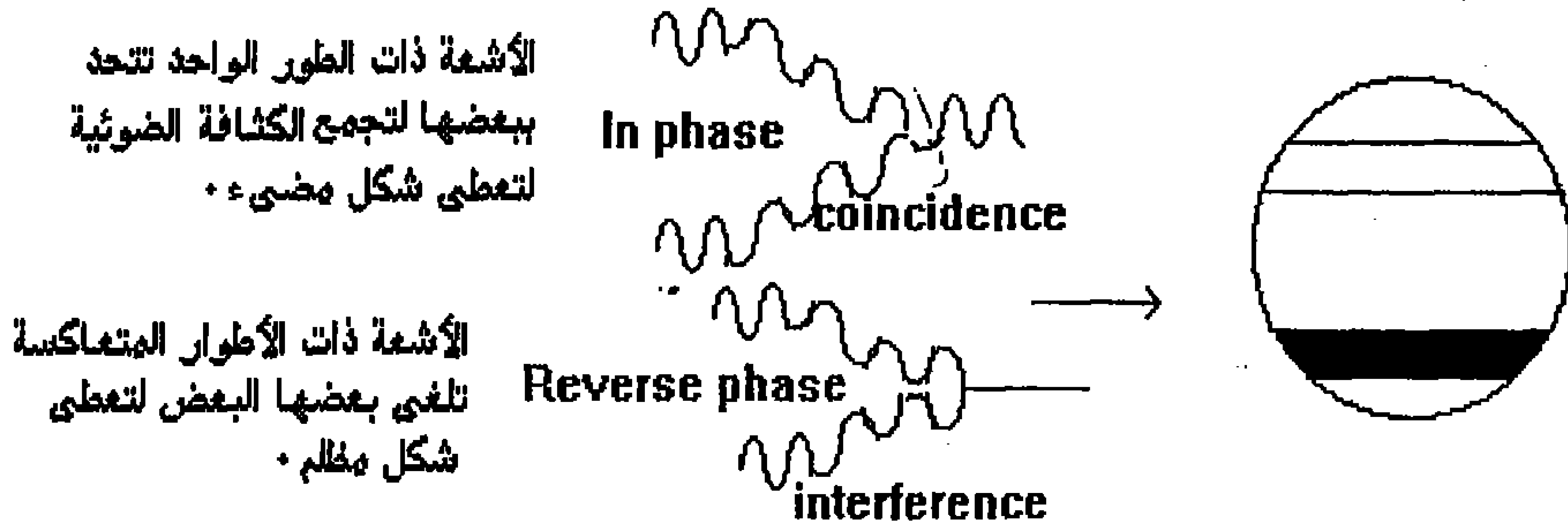
الآشعة الضوئية المباشرة والمنحرفة Direct and Diffracted light rays

إن الآشعة الضوئية المارة خلال جسم شفاف تخرج منه إما مباشرة أو منحرفة٠ والآشعة التى تنفذ دون أن يحدث لها أى تغيير تعرف بالمباشرة Direct وهذه الآشعة لا تتأثر كثافتها أو طورها (شكل ٦)٠



شكل ٦: الأشعة الضوئية المباشرة والمنحرفة – إن كل شعاع يمر خلال فتحة ضيقة أو وسط شفاف يمر منه جزء كشعاع مباشر علاوة على أشعة أخرى لها درجات عديده من الإنحراف٠ ومن الواضح أن الأشعة المنحرفة ليست فى نفس طور out of phase الأشعة المباشرة٠

أما الاشعة التى تنحرف أثناء مرورها البطىء نتيجة للإختلافات الموجودة بين كثافة الأشياء المارة بها تخرج منها منحرفة وهذه تعرف بالأشعة المنحرفه Diffracted وهذه الآشعة هىالتى يتأخر بمعدل ربع طول موجتها والفكرة الأساسية وراء طريقة تباين الأطوار من الفحص المجهرى هو أنه إذا أمكن ضم كلا النوعين من الضوء المباشروالمنحرف المارين خلال أى جسم فى طورواحد فإن الكثافة الضوئية الناتجة تكون عبارةعن مجموع هاتين الآشعتين معا٠وهذه الزيادة فى الكثافة الضوئية سوف توفر توهج brightness للجزء المفحوص٠ ويمكن إظهار ذلك بطريقة أخرى فإنه إذا تعاكست آشعتين لكل منهما نفس الكثافة (مع نقص ٢/١طول موجاتها) فإن كثافتهما الضوئية تلغى بعضها البعض ويظهرالجسم فى حالة إظلام تام٠وهذه الظاهرة تعرف بالتداخلinterference (شكل٧)٠



شكل ٧ : يوضح التضامن Coincidence و التداخل الضوئى٠

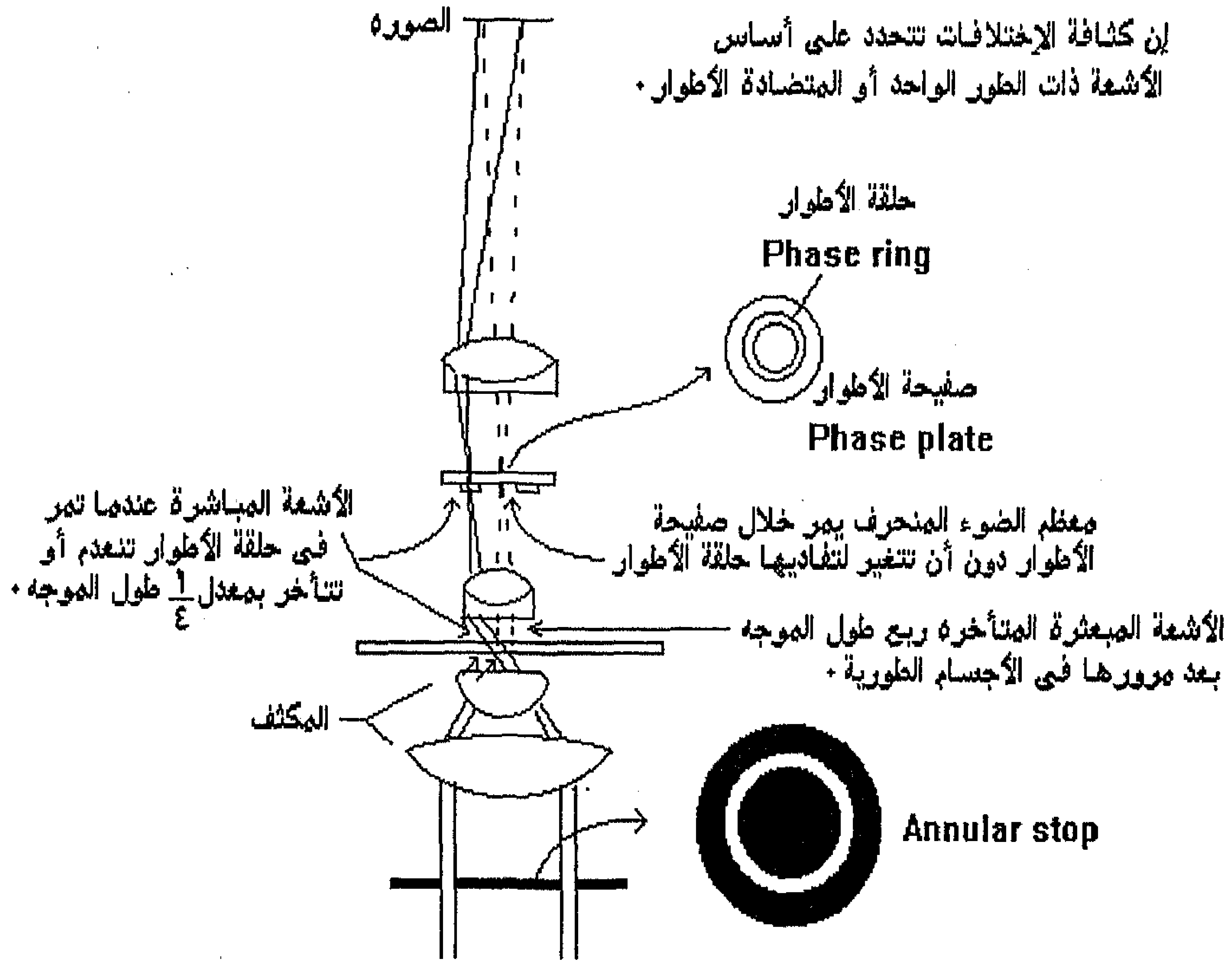
ومجهر الأطوار المتباينة الذى إكتشفه زيرنايك Zernike بدء بإستعمال إضافات مختلفة الى الحجاب المجهرى يمكن لها أن تؤخر من تقدم الضوء المباشر ٠راجع شكل(٥) والمجهر ذوإضافات تباين الأطوار يختلف عن المجهر ذو الحقل المضىء فى إحتواءه أولاً على نوع مختلف من الحجاب diaphragm

كما سبق أن ذكرنا وثانياً على صفيحة طورية phase plate والحجاب المميز لهذا المجهر يتكون من مانع حلقى annular stop يسمح بمرور مخروط أجوف من الأشعة الضوئية hallow cone of light rays لتستمر حتى تصل إلى المكثف condenser ثم إلى الشريحة ثم إلى الجزء المفحوص٠والصفيحة الطورية هى عبارة عن قرص موضوع فى نهاية بؤرة العدسة الشيئية٠ وعليها حلقة طورية phase ring وهذه الحلقة تقدم أو تؤخر من الضوء المباشر بمعدل ربع طول موجاته٠

لاحظ فى شكل (٨) أن الآشعة المباشرة تتجمع عند الحلقة الطورية ليتقدم الضوء المباشر أو يتأخر بمعدل ٤/١ طول موجاته ٠ وهذه الآشعة تخرج وكأنها خطوط متصلة خلال الجزء المفحوص على الشريحة وهذه الحلقة الطورية مطلية بمادة يمكنها إحداث النقل الطورى phase shift السابق الإشارة إليه٠ وعلى النقيض نجد أن الآشعة المنحرفة refracted والتى حدث لها تأخير فى طول موجاتها بمعدل الربع أيضاً نتيجة لمرورها فى أطوار الجسم المفحوص على الشريحة لا يمكنها الوصول للحلقة الطورية ولا تتأثر بالصفيحة الطورية الموجوده بالشيئية٠

ليكن من المعلوم أن تبعاً لنوعية المجهر المستعمل فإن الصورة النهائية قد تكون إما زاهية نتيجة لتضامن فى الكثافات الضوئية amplitude summation وهذه تعرف bright phase microscopy أو تكون الصورة النهائية معتمة نتيجة لتداخل الكثافة الضوئية amplitude interferenec وإنعكاس للأطوار phase reverse ويعرف هذا النوع dark phase microscopy وظهور الصورة النهائية بطريقة زاهية أو معتمة تكون متلازمة مع مربع الكثافة الضوئية وعلى ذلك فإن الصورة النهائية تكون أربع مرات أزهى أو أربع مرات أدكن من تلك التى يمكن مشاهدتها بالمجهر ذو الحقل المضىء٠

ويجب أن نشير هنا إلى أن الأقراص الطورية المستعملة phase plates فـى بعـض المجـاهر تكـون مغلفـة أو مدهونـة بمـادة يمكنهـا أن تغـير مـن أطوار الآشـعة المنحرفـة إلا أن النتـائج النهائيـة تكـون متشـابهة مـع غيرهـا مـن المجاهر التى تستعمل أقراص غير مدهونة٠



شكل ٨ : النظم العدسيه لمجهر تباين الأطوار

Optical system of phase - contrast microscope.

ضبط مجهر الأطوار المتباينة

كما سبق أن ذكرنا فإن هـذا النـوع مـن المجـاهر يختلـف عـن المجهـر العادى فى أن مسار الضـوء يجـب أن يضبـط بحيـث يكـون المخـروط الضوئـى

الصادر من الحجاب الدائرى ممركزاً تماماً مع القرص الطورى فى الشيئية ولإجراء ذلك فإن المجهر يكون مجهزاً بمسامير معظمها أسفل المسرح المجهرى تحرك لتمركز الحجاب الدائرى مع القرص الطورى فىالشيئية والتى تشاهد كحلقات وعادة يكون المجهر(Carl Zeiss) مجهز بثلاث شيئيات طورية phase objectives وكذلك ثلاثة حلقات بالمكثف كل منها تناظر الشيئية الخاصة بها وعادة يكون لمثل هذا المجهر حجاب خاص بالأطوار المتباينة •

التمرين الثالث

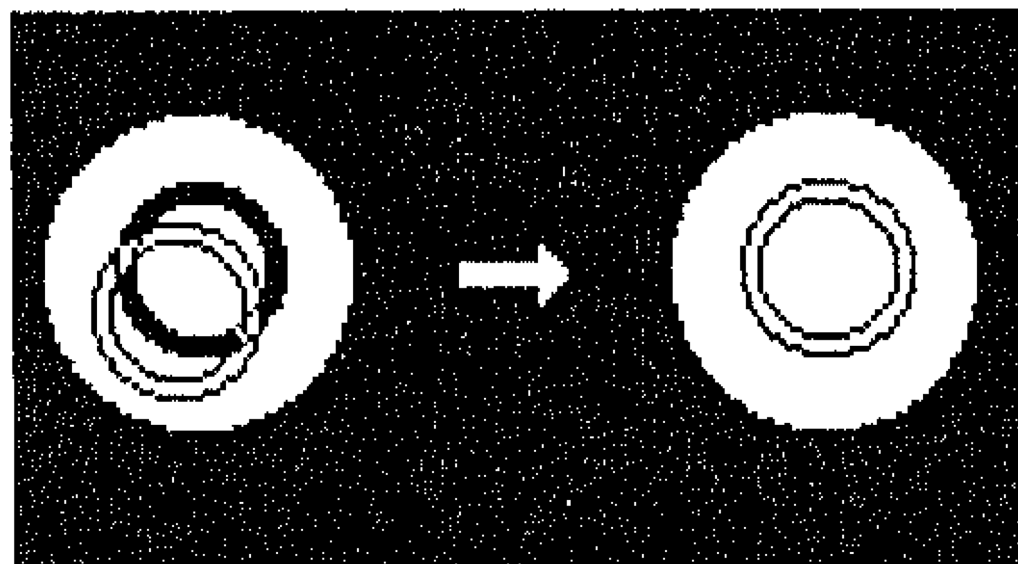
١ـ يرفع المكثف والحجاب العادى ويوضع مكانه حجاب ومكثف الأطوار المتباينه وله ثلاث عدسات (١،٢،٣) بها أقراص طورية وعدسة رابعة خالية من الأقراص •

٢ـ تستبدل الشيئيات العادية من المجهر بشيئيات طورية (ثلاث شيئيات ١،٢،٣) حيث نستعمل الشيئية رقم ١ مع فتحة المكثف رقم (١) وهكذا •

٣–عندما نشاهد حلقتين متراكبتين حرك يد الحجاب حتى تنطبق الحلقتين على بعضهما تماماًوفى هذه الحالة يكون المجهر معد للتشغيل (شكل ٩)•

٤ـ حرك يد المكثف لتستحضر العدسة الخالية من الأقراص فى مسار الضوء•

٥ ـ أفحص الشرائح المراد دراستها ويراعى أن يكرر ضبط الحلقات كلما تغير إستعمال شيئية بأخرى مع مراعاة أرقامها وأرقام فتحات المكثف أو الحجاب•



شكل ٩ : الصوره اليمنى تبين تطابق حلقة الشيئية مع حلقة المكثف فى مجهر الأطوار المتباينه•

المجهر ذو الآشعة فوق البنفسجية

إن من المميزات الأساسية لهذا النوع من المجاهر هوالحصول على درجة أعلى من الوضوح وبالتالى درجة أعلى من التكبيرعنها عند إستعمال الضوء المرئى•وذلك لأن الآشعة فوق البنفسجية ذات موجات أقصر طولاً • وكما سبق أن ذكرنا أن طول موجات الضوء المرئى يعتبر عاملاً محدداً للقدرة التميزية وأن إستعمال الآشعة فوق البنفسجية يزيد من قوة التكبير والتمييز بما يقرب من مرتين أو ثلاث مرات عن تلك المتحصل عليها بالمجهر الضوئى فبواسطته يمكن تمييز جسمين يبعدان عن بعضهما بمسافة١, ميكرون•

والمجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية يكون مزوداً بشيئيات مصنعة من مادة الكوارتز بدلاً من الزجاج وليس له عينيات بل يكون مجهزاً بكمرات تصور العينات المفحوصة والتى تحمض وتكبر صورها فيما بعد•

ويستعمل هذا النوع من المجهر عند إستعمال الأصباغ الفلورسنتية التى تمتص الآشعة فوق البنفسجية ثم تشع موجات أكبر طولا مثل صبغة auramine O والتى تستعمل فى صبغ خلايا ميكروب السل ثم تفحص بالمجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية فتظهرخلايا السل مضيئة فى حين يبدو باقى الحقل مظلماً•

المجهر الإلكترونى

يختلف المجهر الإلكترونى (شكل ١٠) فى مكوناته وطريقة تشغيله عن المجاهر الأخرى فهو يتميز بقدرة تكبيرية وإيضاحية عاليتين تزيد مائة مرة عن المجهر الضوئى ويرجع ذلك إلى القصر المتناهى لموجات الإشعاع الإلكترونى إذ يمكن به التمييز بين جسمين صغيرين يبعدان عن بعضهما بمسافة ٠,٠٠٠١ من الميكروميتر أو يمكنه أن يوضح الأجسام الصغيرة ذات الأقطار ٠,١ نانوميتر فأكثر ولما كان من الممكن تكبير الصور المأخوذة بواسطته عدة مرات فيمكن تكبير هذه الصور عشرات المرات أيضاً دون التأثير على دقة تفاصيلها.

والمجهر الإلكترونى يتميز بمصدر إضاءة ومكثف وعدسات شيئية ومكان لوضع العينه فى وضع يقابل المسرح المجهرى. وكل هذه المكونات عبارة عن مجالات مغناطيسية وليست عدسات بالمفهوم المعتاد كما أنه ليس له عينيات بل يتميز بوجود شاشة فلورسنتية تعرض عليها الصور الناتجة مكبرة بما يقرب من العشرين الف مرة- كما يمكن تكبير الصور المأخوذة عشرات المرات أيضاً. وتجهز العينة بشكل غشاء خاص رقيق فوق شبكة معدنية صغيرة توضع فى مكان مخصص لها بين المكثف والشيئية السالفتى الذكر وهى بذلك تكون فى وضع يقابل مسرح المجهر الضوئى ويجهز المجهر بمصدر إلكترونى يولد آشعة إلكترونية تمر خلال أنبوبة المجهر التى تفرغ تماماً من الهواء (شكل١٠أ).

ويشترط وضع مثل هذا النوع من المجهر فى مكان مخصص له مكيف الهواء بحيث تكون أجهزة التفريغ فى مكان مجاور بعيداً عن غرفة التشغيل.و(شكل١٠ب) يبين الأجزاء المختلفة لهذا المجهر ومقارنتها بمثيلها فى المجهر الضوئى.

التمرين الرابع

لتحضير الخلايا المراد فحصها نجرى الأتى :

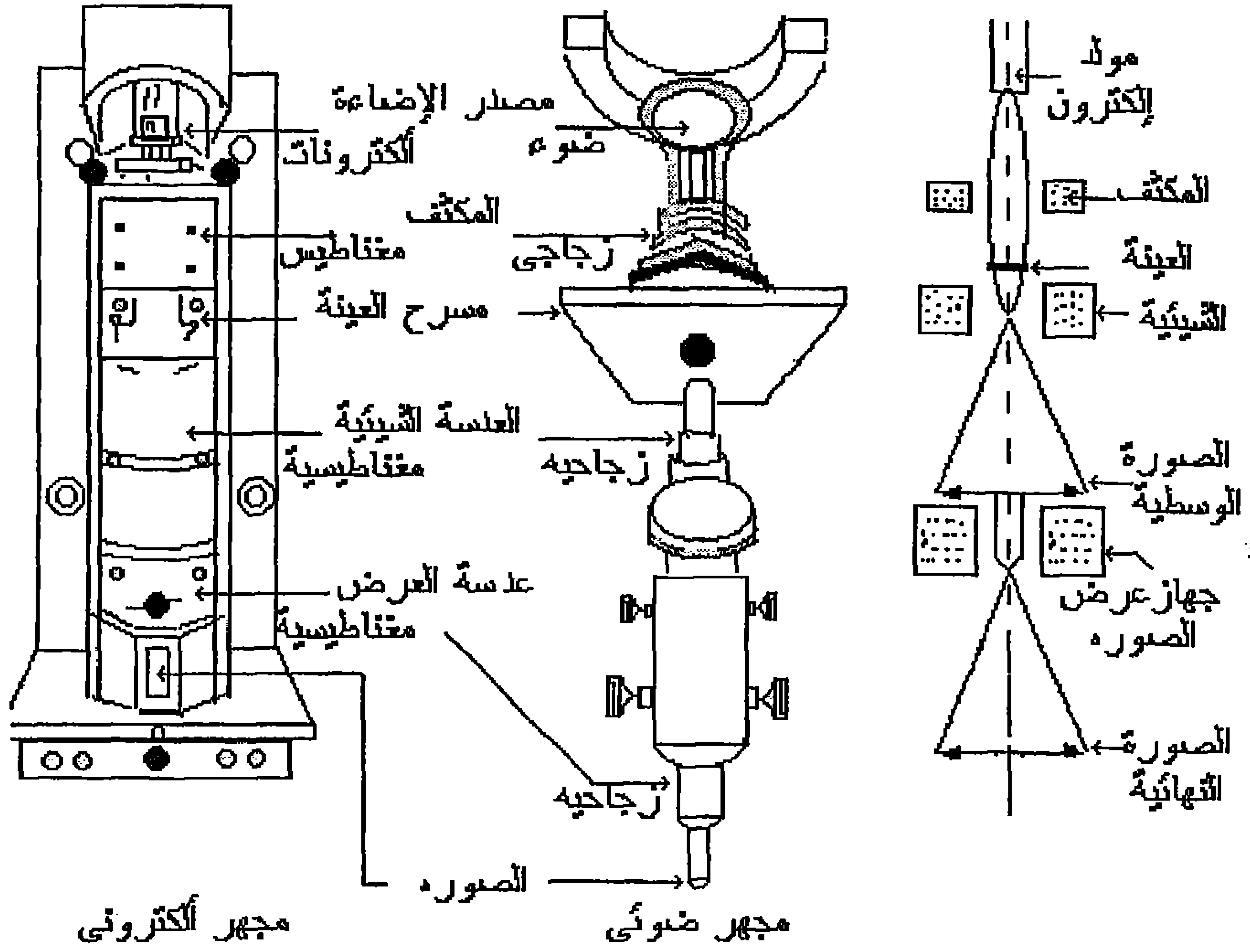
١ـ توضع عدة نقط من الكلوديون فوق كمية من الماء فى كأس سعة ٥٠٠مل فينتشر الكلوديون على سطح الماء بشكل غشاء رقيق ٠

٢ـ يوضع قرص دائرى صغير (Grid) من السلك المجدول بشكل مربعات صغيرة فوق الغشاء المتكون ثم يقطع الغشاء حول القرص ثم يرفع القرص ويوضع نقطة من معلق الخلايا على القرص ثم يوضع على ورقة ترشيح جافة ٠

٣ـ توضع ورقة الترشيح بما عليها من أقراص فى جهاز التظليل بالمعادن ٠

٤ـ نوصل الدائرة الكهربية لجهاز التظليل بواسطة قطعة سلك من الذهب أو التنجستين أو أى معدن آخر ترغب فيه ثم توصل بالتيار الكهربى ليتجزء المعدن بشكل أبخرة من جزيئات المعدن وتترسب فوق الأقراص بما عليها من خلايا . وتعرف هذه العملية بالتظليل Shadowing ٠

٥ـ يرفع القرص ويوضع بالمكان المخصص له فى المجهر الألكترونى المجهز للأستعمال . ثم يفحص محتويات كل مربع من مربعات القرص وذلك بتحريك ضابط لتظهر المربعات بما تحتويها على شاشة العرض فى المجهر الألكترونى ٠



شكل ١٠ أ : لأجزاء الأساسية مجهر الكترونى (الكترومغناطيسى) لاحظ مسار الألكترونات وتكوين الصورة.

شكل ١٠ ب: الأجزاء الأساسية للمجهر الألكترونى وما يماثلها فى المجهر الضوئى.

والجدول التالى (جدول ١) يبين مقارنة للطرق المجهرية المختلفة المستخدمة فى دراسة وفحص البكتيرات .

جدول ١: مقارنة بين الطرق المجهرية المختلفة مع بيان مزايا وعيوب كل منها:

الطريقة	المميزات	العيوب
استعمال المجهر الضوئى مع الحقل المضىء.	يستعمل فى فحص الخلايا الحية أو الميتة المثبتة والمصبوغة.	لايمكن تمييز الأشياء التى يقل قطرها عن ١٥,٠-٢,٠ ميكرون.
استعمال المجهر الضوئى مع الحقل المظلم	يستعمل فى فحص الخلايا الحية حيث يمكن بواسطة هذه الطريقة رؤية التركيبات التى لا يمكن مشاهدتها بطريقة أخرى.	لاتزيد القوة التمييزية لهذه الطريقة عن الطريقة السابقة فيما عدا أنه يمكن رؤية الجزيئات الغروية أكبر حجماً.
المجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية	تزداد قدرة التمييز حيث يمكن بواسطته رؤية الأجسام الصغيرة الحجم	تمتص الآشعة فوق البنفسجية بواسطة القواعد النووية مثل البيورينات والبريميدينات Purines&Pyrimidines حيث يمكن رؤية أجسام حلقية بكثرة داخل الخلايا.
مجهر الأطوار المتباينة Phase-contrast	يستعمل فى فحص الخلايا الحية أو المثبتة وغير المصبوغة حيث يمكن بواسطته تمييز التركيبات التى لايمكن رؤيتها بغيره من الطرق.	لايمكن بواسطته معرفة طبيعة تركيب المرئيات الجديدة التى يميزها.
المجهر الإلكترونى	قدرته التمييزية مرتفعة جداً تصل إلى مائة مرة قدر تلك المشاهدة بالمجهر الضوئى.	يجب أن تكون التحضيرات جافة كما أن الإختلافات فى بعثرة الإلكترونات لايمكن تعليلها.

فحص ودراسة حركة البكتيرات

Motility of Bacteria

بعض البكتيرات تكون متحركة Motile حركة حيوية Vital movement في حين أن البعض الآخر لاتتحرك، وهذه الحركة الحيوية تعزى إلى وجود أعضاء للحركة تسمى الأسواط Flagella،

ويمكن دراسة حركة البكتيرات بالفحص الميكروسكوبى لخلايا البكتيرات الحية غير المصبوغة بواسطة تحضير النقطة العالقة Hanging drop prepartion ويجب التمييز بين الحركة الحقيقية الحيوية التقدمية للبكتيرات وبين الحركة البراونية Brownian movement فالأخيرة حركة تذبذبية للأمام والخلف تحدث لأى جسم صغير سواء كان حياً أو ميتاً يكون عالقاً فى سائل ما، وذلك نتيجة لإصطدام جزيئات السائل بهذا الجسم دون تغيير فى وضع الجسم بالنسبة للأجسام الأخرى العالقة فى السائل،

عند محاولة التعرف على نوع جديد مجهول من البكتيرات فمن الضرورى التعرف على أنه متحرك أو عديم الحركة وهناك عدة طرق يمكن إتباعها للتعرف على ذلك ولكل طريقة مميزاتها وعيوبهاوعلى الدارس أن يختار الطريقة التى تناسب وترضى دراسته وفيما يلى وصف لكل من هذه الطرق،

أ- التحميل الرطب Wet movement

التمرين الخامس (أ)

١- ضع نقطة من معلق البكتيره أو من المزرعة السائلة على سطح شريحة نظيفة،

٢- غطى النقطة بغطاء شريحة رقيق ،

٣- يفحص التحضير بإستعمال مجهر الأطوار المتباينة مع إستعمال العدسة الشيئية الكبرى والجافة ويحكم على الخلايا بالحركة إذا شوهدعدد قليل منها تتحرك حتى ولو كان غالبية الخلايا المختبره غير متحركه.

وعند إستعمال المجهر ذو الحقل المضيء فمن الضرورى أن تصل الإضاءة إلى الحد الأدنى وبإستعمال العدسة الكبرى الجافة يمكن بعدها وضع نقطة من زيت السيدر على غطاء الشريحة وتحرك القطعة الأنفية لتستحضر العدسة الزيتية. وتعتبر هذه الطريقة أسرع الطرق للتعرف على الحركة ونفس التحضير يمكن أيضاً أن يدرس خلاله شكل الخلايا وتجمعاتها المنتظمة فى مكعبات أو أزواج أو سلاسل أو تكون فى تجمعات غير منتظمة حيث أن إستعمال الحرارة لتثبيت الغشاء البكتيرى يؤثر على مظهر الخلية وعلى طريقة تجمعها.

ومن عيوب هذه الطريقة أن التحضير يجف بسرعة مما يمتنع معه الحركة أو يكون الكائن ممرض للإنسان وهناك إحتمال لعدوى الفاحص .

ب - طريقة النقطة العالقة Hanging Drop Method

إذا أريد فحص حركة الكائن البكتيرى لفترة طويلة يستحسن إتباع هذه الطريقة. وفيها تفحص الخلايا وهى سابحة فى نقطة من المزرعة وهذه النقطة تكون عالقة على سطح غطاء شريحة ومدلاة فى تجويف فى شريحة ذات تجويف يقابل الغطاء فبذلك تكون النقطة العالقة وكأنها فى حجرة زجاجية مغلقة لايسمح لها بالجفاف إلا بعد مرور وقت طويل.

وأحياناً يكون من الصعب دراسة الحركة بهذه الطريقة حيث أن التجويف الموجود بالشريحة يكون أسمك من الشريحة العادية فهذا يحتاج إلى إتباع طريقة خاصة لبؤرة الأجسام المرئية . كما يجب مراعاة الحرص الشديد

حتى لا ينكسر غطاء الشريحة لشدة قربه من العدسة الشيئية وتسهل عملية الفحص إذا ما بدأ بدراسة ما بداخل حافة (محيط) النقطة العالقة وما تحتويه من خلايا وتفحص النقطة العالقة عادة بإستعمال المجهر ذو الحقل المضيء سواء بالقوة الكبرى الجافة أو الزيتيةويمكن بهذه الطريقةأيضا دراسة شكل وتجمعات الخلاياعلاوة على تحركها٠

التمرين الخامس (ب)

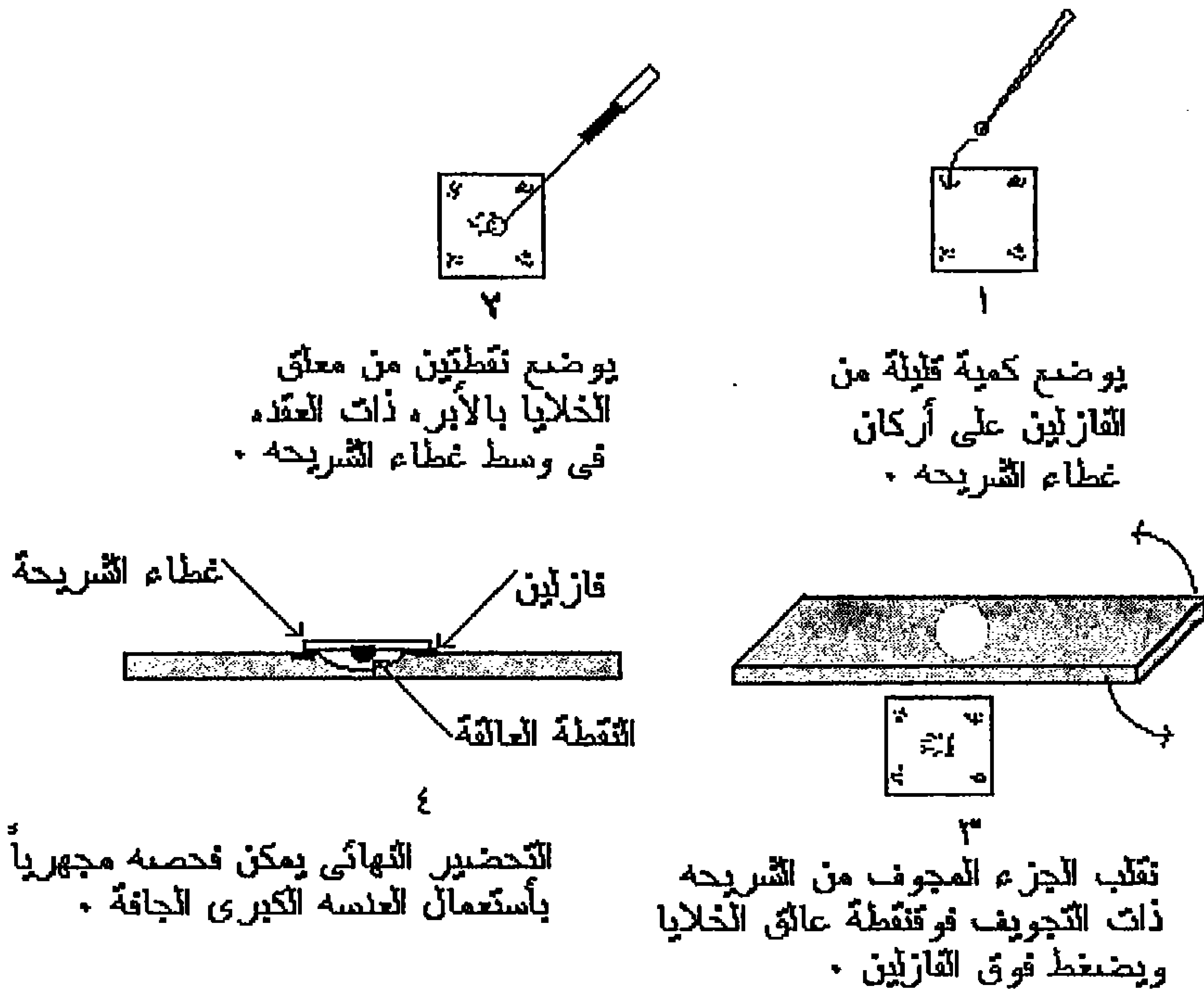
١ـ إنقل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة نقطة صغيرة من المزرعة البكتيرية حديثة العمر(١٨–٢٤ساعة) نشطة النمو سواء نامية فى بيئة سائلة أم صلبة وفى الحالة الأخيرة يراعى تعليق النمو فى نقطة من الماء المعقم أو ماء معقم به قليل من الببتون وضعها فى مركز غطاء الشريحة النظيف ٠ (يراعى النظافة التامة للشرائح المستعملة وأغطيتها)٠

٢ـ إنقل بواسطة الإبرة ذات العقدة أربع نقط صغيرة جداً من الفازلين وضعها حول حواف تقعير الشريحة المقعرة النظيفة ويمكن أيضاً وضع نقطتين صغيرتين من الماء عند ركنين من أركان غطاء الشريحة المربع الشكل (شكل١١–أ) لابد من وضع ٤ نقط حول حواف التقعير (يمكن استعمال أجزاء صغيرة من الفازلين بدلاً من الماء)٠والغرض من ذلك هو تثبيت الغطاء بالشريحة المقعرة وعدم تبخر النقطة العالقة أثناء الفحص٠

٣ـ إقلب بإحتراس غطاء الشريحة ثم ضعه فوق الجزء المقعر للشريحة المقعرة Concave slide بحيث تكون النقطة المعلقة فى منتصف التقعير بدون أن تلامس قاعه (شكل١١ـ أ) ٠

٤ـ ضع التحضير على مسرح الميكروسكوب مستعملاً الشيئية الصغرى (١٦مم)٠ حرك الضابط التقريبى حتى تظهر حافة النقطة العالقة ويراعى تحريك الشريحة حتى تظهر حافة النقطة فى منتصف الحقل الميكروسكوبى، ونظراً لأن النقطة شفافة فإن حافتها لن تظهر إذا كانت الإضاءة شديدة لذلك يجب تقليل الإضاءة بقفل الحجاب جزئياً وتخفيض المكثف قليلاً (لاتفحص حافة تقعير الشريحة بدلاً من حافة النقطة)٠

٥ـ أدرالقطعة الأنفية لإستبدال الشيئية الصغرى ١٦مم بالشيئية الكبرى ٤٠مم٠



شكل ١١ ـ أ : تحضير النقطة المعلقة٠

٦ـ إفحص حافة النقطة المعلقة مع إستعمال المعدل الدقيق• عدل الإضاءة بخفض أو رفع المكثف واستعمال الحجاب حتى ترى الأحياء الدقيقة عند الحافة بوضوح•

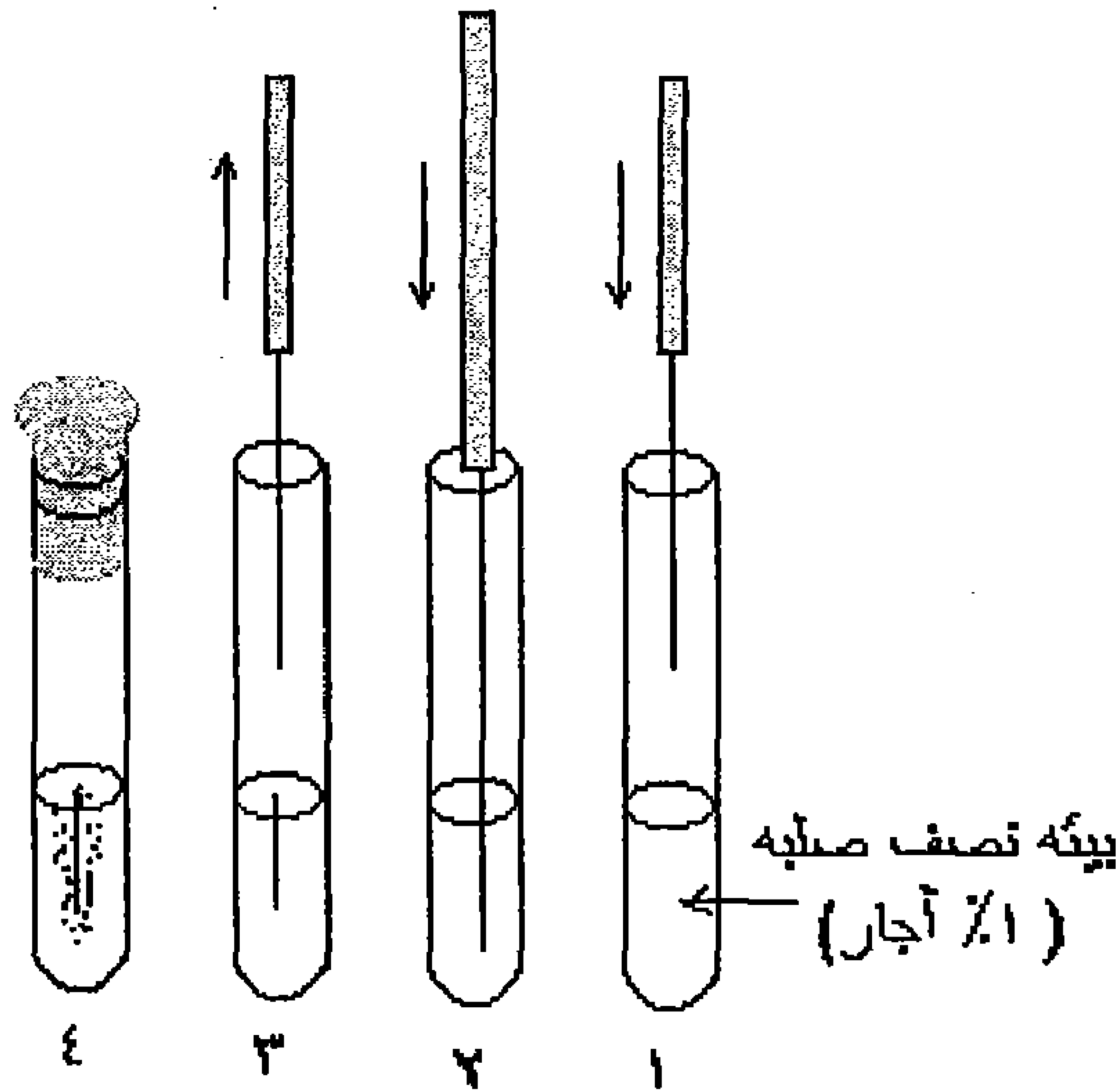
٧ـ صف مع الرسم حركة وشكل وطريقة تجمع خلايا الكائنات الآتية: مع بيان نوع الحركة• *Corynebacterium facians, Bacillus subtilis,* *Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli , Sarcina lutea ,* (خميرة)

جـ ـ طريقة الآجار نصف صلب

التمرين الخامس (جـ)

لقح آجار عميق نصف صلب عن طريق الوخز كما هو موضح بالشكل ١١ ـ ب ضع الأنابيب بالحضان ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

يمكن الحكم على حركة البكتيريات من طبيعة النمو على طول خط الوخز كما هو بشكل ١١ ـ ب •



شكل ١١ ـ ب خطوات الوخز العميق لاختبار الحركة تعكير البيئة حول خط التلقيح تعنى الحركة كما فى (٤) ـ يمكن الحكم على الحركة من طبيعة النمو .

تحضير الغشاء البكتيرى تهيئة للصبغ

التمرين السادس (أ)

١ـ إغسل الشريحة الزجاجية جيداً بالماء والصابون ثم جففها جيداً وتعامل معها من حوافها وليس من سطحيها٠

٢ـ أكتب على أحد جوانب الشريحة الحرف الأول من اسم الجنس والحرف الأول من اسم النوع البكتيرى المزمع فحصه بقلم Marker٠

٣ـ ولتحديد مكان الفحص ارسم بنفس القلم دائرة فى منتصف السطح السفلى للشريحة وعندما يزداد مرانك سوف لاتحتاج إلى هذه الخطوة٠

٤ـ رج المزرعة السائلة جيداً ثم انقل ملىء حلقة الإبرة ذات الحلقة بالمزرعة وذلك بعد تعقيمها وضعها على السطح المقابل للدائرة السابق رسمها على السطح المقابل٠ لاتنسى أن تعقم الإبرة بعد هذه العملية أيضاً٠

٥ـ فى حالة المزارع النامية على آجار مائل٠ ضع على الشريحة نقطة من الماء٠ ثم التقط بواسطة الإبرة المعقمة كمية ضئيلة من النمو البكتيرى ثم إخلطها بنقطة الماء جيداً٠ لاتنسى تعقيم الإبرة بعد الإستعمال٠

٦ـ ثم بواسطة الإبرة إفرد نقطة المزرعة فى مساحة ٢/١ بوصة على سطح كل من سطحى شريحتين نظيفتين ٠ ثم عقم الإبرة مرة أخرى ٠

٧ـ أترك الشريحتين ليجفا فى الهواء وبعد جفافهما تماماً مررهما فوق الهواء الساخن المنبعث من لهب مصباح بنزن لقتل الخلايا وتثبيتها على سطح الشريحتين ٠

٨ـ ضع نقطة من الفوكسين على أحدى الشريحتين وأتركها لمدة دقيقة ـ ثم أغسلها وجففها ٠

٩ـ ضع نقطة من زيت السيدر على كل من الشريحتين ثم أفحص الخلايا بكل منهما بالعدسة الزيتية٠

١٠ـ لاحظ أن الخلايا غير المصبوغة لا تظهر بوضوح لشفافيتها فى حين أن المصبوغة ترى واضحة ٠

الأصباغ المستعملة لصبغ البكتيرات

نظراً لشفافية الخلايا البكتيرية فهى تصبغ حتى يسهل رؤيتها فى التحضيرات الميكروسكوبية٠ وعلاوة على ذلك فإن صبغ البكتيرات يعتبر ضرورياً لسهولة التعرف على بعض التركيبات الخلوية الخارجية، مثل الأسواط والغلاف أوالداخلية مثل الحبيبات والجراثيم الداخلية، والأجسام النووية وغيرها من التركيبات الدقيقة٠

ويمكن تقسيم الصبغات المستعملة إلى ما يلى:

أولاً صبغات طبيعية: Natural dyes

وهى التى تنتج طبيعياً ويمكن إستخلاصها من أنسجة النباتات وبخاصة فى الدراسات السيتولوجية ومن أمثلتها صبغة الهيماتوكسلين Hematoxylin والتى تستخرج من نبات *Hematoxylin campechianum* وهذه الصبغة فى حد ذاتها لا تصبغ الأنسجة إلا فى وجود أيونات من الحديد (وفى صورة حديديك Ferric) أو أيونات الألومنيوم Aluminum٠

ثانياً صبغات صناعية أو تركيبية: Artificial or Synthetic dyes

وهى التى تستعمل حالياً بكثرة وتستخلص من قطران الفحم، ولذلك تسمى أصباغ قطران الفحم Coal-tar dyes وأصباغ قطران الفحم هى عبارة عن مشتقات من المركب الحلقى البنزين C_6H_6 أوالكينون $C_6H_4O_2$ وقد تسمى أيضاً

أصباغ الأنيلين Aniline dyes ، وبالرغم من وجود كثير من الصبغات الحالية ليست أنيلينية، إلا أنها تسمى كذلك مجازاً حيث أن أول صبغة استعملت من هذه الصبغات كانت مشتقة من الأنيلين.

ونظراً لأن التركيب الكيماوى للأصباغ عموماً معقد ولا يمكن تداوله فى المجال التجارى، لذا يفضل المنتجون لها إعطاء أسماء خاصة للأصباغ التى ينتجونها، ولذلك فإن صبغة معينة قد تباع بالأسواق تحت أسماء مختلفة، فمثلاً الماجنتا Magenta و الفوكسين، إسمين مختلفين لصبغة واحدة حمراء وردية تركيبها الكيماوى بارا–روز أنيلين، ومنعاً للإرتباك وضعت مواصفات خاصة لكل صبغة، ونشرت جمعية الصباغين بانجلترا دليل الألوان Colour Index، وضع فيه رقم خاص لكل صبغة.وفى ألمانيا وضع شولز Schultz نشرة مماثلة للدليل السابق فمثلاً الصبغة CI No.841 أو Schultz No.679 تدل على أن الصبغة هى السفرانين.

نظريات الصبغ Theory of staining

هناك عدة نظريات يفسر على أساسها حدوث الإصطباغ عند استعمال الصبغات المختلفة منها ما يستند على أسس فيزيائية ومنها ما يستند على أسس كيماوية.

(١) النظرية الفيزيائية physical theory

تعرف العملية الفيزيائية بأنها تفاعل بين مادتين دون أن يتكون مركب جديد نتيجة للتفاعل وتفسر عملية الإصطباغ بأنها نتيجة الخاصية الشعرية أو القوى الأسموزية أو إلى الإدمصاص أو الإمتصاص.

(ب) النظرية الكيماوية Chemical theory

يتكون نتيجة للتفاعل الكيماوى بين الصبغة والمادة المصبوغة مركب جديد له صفات طبيعية وكيماوية مختلفة عن المواد المتفاعلة الأصلية، وبالتالى لايمكن استرجاع المواد المتفاعلة الأصلية بواسطة المذيبات البسيطة.

وعندما تصبغ البكتيرات بالصبغات السالفة الذكر، لايوجد دليل قوى يبين أن الصبغة تتغير كيماوياً ليتكون مركب جديد لايمكن استخلاصه.ففى الحقيقة يمكن استخلاص كل الصبغة تقريباً من الخلية البكتيرية المصبوغة عقب غمرها لمدة طويلة فى الماء أو فى الكحول أو فى المذيبات الأخرى، ومن الناحية الأخرى توجد مكونات فى الخلية تعتبر حمضية فى تفاعلها وأخرى ذات تأثيراً قلوياً، وعلى ضوء هذه الحقيقة يمكن تفسير ظاهرة الصبغ على أساس كيماوى بحت، فالصبغات الحمضية تتفاعل مع المكونات القاعدية من الخلية (السيتوبلازم) والصبغات القاعدية تتفاعل مع المكونات الحمضية من الخلية (كروماتين النواه).مما تقدم يتضح لنا التضارب فى تفسير إصطباغ البكتيرات. والواقع أن عمليات الإصطباغ لاتتم بالبساطة السابق وصفها. وربما كانت هذه النظريات لاتفسر كل الحقائق.وقد يكون صبغ الخلايا عبارة عن عملية فيزيائية وكيماوية فى نفس الوقت.

معمق اللون Mordant

فى بعض محاليل الصبغات يمكن إضافة مواد لها قابلية بأن تجعل بعض التركيبات تأخذ كمية من الصبغة أكثر عنه فى حالة غياب هذه المادة، وتسمى هذه المواد بمعمقات الألوان Mordants مثل حمض التانيك Tannic acid واليود وأيونات الحديديك.

الصبغ البسيط Simple Staining

يقصد بالصبغ البسيط استعمال صبغة مفردة فى صبغ خلايا البكتيرات ويتم الصبغ بعد أن يحضر غشاء من معلق الخلايا البكتيرية فى الماء على شريحة نظيفة ويثبت الغشاء بعد ذلك حرارياً وذلك بترك الشريحة أولاً ليجف عليها الغشاء بجو المعمل، ثم تمرر الشريحة عدة مرات فى لهب بنزن لتثبيته ٠ وتعتبر طريقة التثبيت الحرارى هذه طريقة مثلى، فالخلايا البكتيرية ذات جدر صلبة لاتتأثر ولا تتشوه عندما تجف وتثبت على هذا النحو٠

ويجب الإهتمام بنظافة الشريحة إذ أن وجود آثار من المواد الدهنية عليها يعيق توزيع معلق الخلايا توزيعاً منتظماً على سطحها كما أن ذلك يؤثر على درجة ثبات الغشاء على سطح الشريحة فيكون عرضه للغسيل أثناء عملية الصبغ٠

ولتحضير الغشاء البكتيرى يفضل استعمال مزرعة نامية على بيئة صلبة حيث أن الغشاء المحضر من مزرعة سائلة مباشرة تشتمل على مكونات البيئة وهى أيضاً قابلة للإصطباغ ،وعلاوة على ذلك فإن وجود مكونات البيئة قد يؤدى إلى تقليل درجة إلتصاق الخلايا بالشريحة أثناء التثبيت٠

التمرين السادس (ب)

١ـ مرر شريحة نظيفة فى لهب بنزن للتخلص مما قد يكون عالقاً بها من آثار دهنية • انتظر حتى تبرد الشريحة، ثم ضع بواسطة الإبـرة ذات العقدة نقطة من الماء فى مركز الشريحة (إذا كانت الشريحة نظيفة فإنه يمكن فرد نقطة من الماء على سطحها بإنتظام بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة، أما الشريحة غير النظيفة فإن نقطة الماء تتجمع عليها بشكل قطرات متفرقة، وبذلك لايتكون غشاء منتظم) •

٢ـ إلمس النمو البكتيرى من مزرعة نامية على آجار مائل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها• (يراعى عدم نقل كمية كبيرة من النمو البكتـيرى أو أخذ جزء من الآجار إلى الشريحة إذ أن ذلك يعيق رؤية الخلايا البكتيريه بوضوح علاوة على العيوب الأخرى الناتجة عن مكونات البيئة)•

٣ـ إنقل ما يعلق بإبرة التلقيح إلى نقطة الماء بمركز الشريحة وإخلطه بها حتى تتكون عكارة خفيفة ، أنشر المعلق البكتيرى الناتج بنفس إبرة التلقيح حتى يتكون غشاء رقيق منتظم•

٤ـ أترك الغشاء ليجف تماماً فى الهواء•

٥ـ ثبت الغشاء الجاف بتمرير الشريحة عدة مرات فى لهب بنزن (يراعى أن يكون سطح الشريحة الذى عليه الغشاء متجهاً باستمرار إلى أعلى)•

٦ـ انتظرحتى تبردالشريحة ثم أغمرسطح الشريحة بكمية كافية من محلول صبغة كربول الفوكسين Carbol fuchsin لمدة دقيقة•

٧ـ تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الشريحة بواسطة الماء الجارى•

٨ـ أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء•

٩- ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً بواسطة العدسة الزيتية ويتم ذلك بعد ضبط الضوء بالإستعانة بالمرآة والمكثف والحجاب مستعملاً القوة الصغرى(١٦مم)٠ ثم تحرك القطعة الأنفية لوضع العدسة الزيتية فى وضع الإستعمال، ثم حرك الضابط التقريبى ليمكن إنزال أنبوبة الميكروسكوب بحذر حتى تنغمس العدسة الزيتية (٢مم) فى نقطة الزيت وتتم هذه الخطوة والعينان تنظران إلى الشريحة والعدسة الزيتية ثم ينظر بعد ذلك خلال العدسة العينية ويحرك الضابط الدقيق حتى ترى الخلايا البكتيرية بوضوح٠

١٠- صف مع الرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات البكتيرية والخميرة الآتى بيانها عند فحص تحضيراتها مصبوغة بكربول الفوكسين:

Corynebacterium fascians , *Bacillus subtilis* , *Sarcina lutea*, *Escherichia coli* , *Pseudomonas marginata* , *Streptomyces sp.* , *Staphylococcus aureus* , *Saccharomyces cereviseae.*

١١- كرر الخطوات العشر السابقة بإستعمال صبغة أزرق الميثيلين بدلاً من صبغة كربول الفوكسين٠

الصبغ المركب Compound staining

تستعمل فى هذه الطرق أكثر من صبغة واحدة، ويعرف هذا النوع من الصبغ أيضاً بالصبغ التفريقى Differential staining ، وخاصة عندما تجرى التفرقة بين البكتيرات فى مجاميع مختلفة تبعاً لتفاعلها مع الصبغة٠

وتعتبر صبغة جرام والصبغ المقاوم للأحماض من أهم طرق الصبغ المركب أو التفريقى المتبعة فى الدراسات البكتيريولوجية٠

أ ـ صبغة جرام Gram stain

أهم طرق الصبغ المركب أو الصبغ التفريقى وأول من إستعملها (كريستيان جرام ١٨٨٤، Christian Gram) ، لذلك فهى تعرف بإسمه وعند إتباع هذه الطريقة نجد أن بعض البكتيرات تصبغ بالصبغة القاعدية (الكريستال البنفسجى Chrystal violet) فى وجود اليود، بدرجة لايمكن معها إزالة الصبغة من الخلايا عن طريق الغسيل بالكحول أو الأسيتون، فى حين أن البعض الآخر من خلايا البكتيرات يمكن إزالة الصبغة منها بسهولة بإستعمال الكحول٠ والمجموعة الأولى من البكتيرات تعرف بالبكتيرات الموجبة لتفاعل جرام Gram positive ٠ أما المجموعة الثانية فهى تعرف بالبكتيرات السالبة لتفاعل جرام Gram negative ٠

ولتسهيل رؤية خلايا المجموعة الثانية تستعمل صبغة أخرى ذات لون أحمر مثل السفرانين Safranin، والتى تضاف بعد الغسيل بالكحول وتسمى بالصبغة العكسية Counter stain، حيث تصطبغ الخلايا السالبة بعدها باللون الأحمر٠

ويبدو أن التفسير الحقيقى لهذا الإختلاف يرجع إلى أسس كيماوية ، إذ أن سطوح الخلايا الموجبة لصبغة جرام أو الجزء القريب من سطوحها، يحتوى

على كميات من ملح الماغنيسيوم لحمض الريبونيوكليك Ribonucleic acid والتى تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوى وصبغة الكريستال البنفسجية واليود، وهذا المركب المعقد يثبت الصبغة فى الخلية ويجعلها أكثر مقاومة للإزالة عند الغسيل بالكحول.

أما البكتيرات السالبة لصبغة جرام فإن التركيب الكيماوى لسطح خلاياها لايحتوى على حمض الريبونيوكليك والماغنيسيوم، لذلك فإن صبغة الكريستال البنفسجى لاتثبت فى الخلايا بالطريقة السابق وصفها فهى تزال عند الغسيل بالكحول.

وبالرغم من أن البكتيرات السالبة لصبغة جرام تظل بإستمرار سالبة لهذه الصبغة، إلا أن البكتيرات الموجبة يمكنها تحت ظروف خاصة أن تظهر تفاعلات متباينة مع هذه الصبغة أو تفقد إيجابيتها لها، فمثلاً المزارع الموجبة لجرام قد تفقد خلاياها القدرة على الإحتفاظ بصبغة الكريستال البنفسجى عندما تتقدم فى السن وتصبح سالبة لها، وكذلك قد تتأثر الخلايا الموجبة لجرام عند إرتفاع حموضة البيئة، كما تفقد الخلايا الموجبة لجرام إيجابيتها إذا عوملت خلاياها بإنزيم Ribonuclease الذى يذيب Ribonucleic acid أو أملاحه من السطح الخلوى، أو إذا سحقت الخلايا الموجبة لجرام مع برادة الزجاج أو الألومنيوم لتكسير جدرها الخلوية فإن بقايا الخلايا المهشمة تفقد إيجابيتها لهذه الصبغة.

وقد أجريت تعديلات طفيفة على الطريقة التى إتبعها جرام، وفيما يلى خطوات الصبغ كما حورها هوكر Hucker وهى الخطوات الأكثر إتباعاً.

التمرين السابع

١ـ حضر غشاء من المزرعة البكتيرية النامية على آجار مائل لمدة ٢٤–٤٨ساعة، ويثبت بتمريره فى اللهب عدة مرات بالطريقة الموضحة سابقا٠

٢ـ إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم اغمر الغشاء بمحلول صبغة الكريستال البنفسجى Crystal violet لمدة دقيقة٠

٣ـ تخلص من محلول الصبغة ثم اغسل الشريحة بالماء الجارى٠

٤ـ أغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة دقيقة٠

٥ـ تخلص من محلول اليود ثم اغسل الشريحة بالماء الجارى ثم أتركها لتجف فى الهواء٠

٦ـ اغسل الغشاء بمحلول كحول الإيثايل (٩٥٪) وذلك بإضافته للشريحة نقطة فنقطة مع إمالة الشريحة ليتساقط منها الكحول بعد مروره على الغشاء وتستمر الإضافة حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون٠

٧ـ إغسل الغشاء بعد ذلك بالماء الجارى٠

٨ـ أغمر الغشاء بمحلول صبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة٠

٩ـ تخلص من محلول الصبغة ثم إغسل بالماء الجارى٠

١٠ـ أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء٠ يمكن الإسراع فى التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن٠

١١ـ ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً بإستعمال العدسة الزيتية٠ إذا كانت الخلايا بنفسجية تكون البكتيرات موجبة لجرام وإذا كانت حمراء تكون البكتيرات سالبة لجرام٠

١٢ـ حضر أغشية مثبتة من البكتيرات *E. coli* , *Corynebacterium fascians, Bac.subtilis* ثم أصبغها بطريقة جرام٠بين تفاعل البكتيرات مع الصبغة ٠ مبيناً شكل ونظام تجمع الخلايا٠

ب ـ الصبغة المقاومة للأحماض Acid Fast Stain

بعض الأنواع التابعة للجنس *Mycobacterium* مثل البكتيره التى تسبب السل *Mycobacterium tuberculosis* تمتلك خواص طبيعية أو كيماوية تجعل من الصعب صبغ خلاياها بالطرق العادية • ولكن إذا عرضت الشريحة للحرارة أثناء الصبغ لمدة طويلة نسبياً، فإن الحرارة تعمل على دخول الصبغة إلى الخلية ويكون من الصعب إزالة الصبغة منها حتى ولو غسلت بالكحول المحمض بحمض HCl مثل هذه البكتيره تعرف بأنها مقاومة للأحماض Acid fast •

أما إذا أمكن إزالة الصبغة من الخلايا بواسطة الكحول المحمض فتعرف بأنها غير مقاومة للأحماض Non-acid fast •

وعلى ذلك فالبكتيرات المقاومة للأحماض تحتفظ بصبغة كربول الفوكسين– التى تستعمل عادة فى هذه الطريقة– وتظهر الخلايا بلون أحمر أما البكتيرات غير المقاومة للأحماض فتزال منها الصبغة عند الغسيل بالكحول المحمض، ولتسهيل رؤية الخلايا غير المقاومة للأحماض تضاف صبغة عكسية Counter stain ذات لون مخالف مثل أزرق الميثيلين،وبذلك تظهر بلون أزرق•

ويرجع السبب الأساسى للإختلاف بين هاتين المجموعتين من البكتيرات إلى وجود تركيزات مرتفعة من الدهون فى الأغشية السيتوبلازمية لخلايا البكتيرات المقاومة للأحماض• وهذه الدهون تمنع أو تؤخر دخول الصبغة إليها أو خروجها منها•ويعتقد بعض الباحثين أن وجود حمض الميكوليك Mycolic acid فى البكتيرات المقاومة للأحماض بنسبة كبيرة قد يكون السبب المحتمل لإيجابيتها• وفيما يلى طريقة Ziehl&Neelsen لصبغ البكتيرات بالصبغ المقاوم للأحماض :

التمرين الثامن

١- حضر غشاء من مزرعة البكتيره *Mycobacterium phlei* وآخر من مزرعة البكتيره *E. coli* ثم يثبت بتمريره في اللهب.

٢- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر منطقة الغشاء بمحلول صبغة كربول الفوكسين. سخن السطح السفلى من الشريحة حتى يتصاعد منها البخار (دون أن تغلى الصبغة) لمدة ٣-٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة بإضافة مزيد من الصبغة إذا لزم الأمر.

٣- إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم تخلص من الصبغة بغسل الشريحة بالماء الجارى.

٤- يضاف الكحول المحمض على الغشاء نقطة فنقطة عند أحد أطراف الشريحة مع إمالتها قليلاً ليتساقط منها الكحول المحمض المستعمل من الطرف الآخر إلى أن يصبح الكحول الحامضى المتساقط عديم اللون.

٥- إغسل بالماء الجارى.

٦- أصبغ الغشاء بمحلول الصبغة العكسية أزرق الميثيلين لمدة دقيقة.

٧- تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الشريحة بالماء الجارى.

٨- أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء، يمكن إسراع التجفيف بتعريض السطح السفلى للشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن.

٩- ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة ثم إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية. بين ما إذا كانت الخلايا مقاومة للأحماض أو غير مقاومة للأحماض. صف مع الرسم شكل ونظام تجمع خلايا البكتيرات المحضرة.

وعلاوة على طرق الصبغ التفريقية السالفة الذكر فإن هناك طرقاً من الصبغ المركب تتبع لإظهار تركيبات خلوية حيث أن هذه التركيبات دون غيرها

تكون أكثر قابلية للإصطباغ بصبغة معينة • ومن ضمن هذه الطرق صبغ الغلاف البكتيرى، صبغ الأسواط البكتيرية، صبغ الجراثيم الداخلية •

صبغ الغلاف Staining of capsule

يحيط بجدار الخلية من الخارج منطقة هلامية لزجة يطلق عليهااسم الغلاف Capsule أو الطبقة الخارجية Outer layer ، أو الطبقة الهلامية Slime layer ويختلف سمك طبقة الغلاف هذه فى البكتيرات المغلفة Encapsulated، وقد لاتوجد هذه الطبقة كلية بالبكتيرات غير المغلفة Nonencapsulated وفى معظم الحالات تتركب مادة الغلاف من عديدات التسكر polysaccharides • ومن المعروف أن طبقة الغلاف هذه يصعب صبغها بالطرق العادية، ولذا يفضل إستعمال طرق خاصة عديدة لصبغ الغلاف منها طريقة Anthony الآتى بيان خطواتها:

التمرين التاسع

١ـ حضر مزرعة حديثة من البكتيره *Klebsiella aerogenes* •

٢ـ حضر غشاء من المزرعة وأتركها لتجف فى الهواء (لاتستعمل الحرارة) •

٣ـ أصبغ الغشاء بمحلول مائى للكريستال البنفسجى لمدة ٢دقيقة •

٤ـ تخلص من محلول الصبغة ثم إغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس (٢٠٪)، (لاتستعمل الماء) •

٥ـ أترك الشريحة لتجف تماماً مرة ثانية فى الهواء •

٦ـ ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية •

٧ـ صف مع الرسم الخلايا وما يحيط بها من منطقة الغلاف-لاحظ أن الخلايا تظهر بلون أزرق غامق، بينما تظهر طبقة الغلاف كهالة زرقاء باهتة •

صبغ الأسواط Flagella staining

ترجع الحركة فى معظم أنواع البكتيرات المتحركة إلى إمتلاك خلاياها أسواطاً فى أطرافها أو على جانبها وحركة البكتيرات وعدد وتوزيع الأسواط على خلاياها تعتبر من الصفات الهامة المميزة للأنواع البكتيرية وتستغل فى أغراض التصنيف٠

وكان يعتقد أن الأسواط عبارة عن تركيبات هشة سهلة التلف٠ وأنه يلزم عند صبغها الإهتمام الزائد بعدم رج البيئة التى تنمو عليها البكتيرات، إلا أن الإتجاهات الحديثة تدل على أنها تركيبات صلبة تتحمل الرج والمعاملة بالطرد المركزى٠

والمشكلة الحقيقية فى صبغ الأسواط هو ضآلة سمكها الذى لايقع فى نطاق القوة التمييزية أو التفصيلية Resolving power للميكروسكوبات الضوئية٠ وعلى ذلك فإن من أهم الخطوات التى تسبق عملية الصبغ إضافة بعض المواد التى تترسب على السوط لتزيد من سمكه بدرجة تجعل من الممكن مشاهدته بالميكروسكوبات الضوئية العادية إذا ما أجرى صبغه٠ ويعتبر حمض التانيك Tannic acid من أهم المواد المستعملة فى هذا الغرض علاوة على أنه يعطى للأسواط قابلية أكثر على تقبل الأصباغ المستعملة٠ وهناك عدة طرق لصبغ الأسواط كلها تحتاج إلى خبرة ومران ودقة فى العمل٠ إلا أن جميعاً تتفق فى ضرورة إستعمال شرائح غاية فى النظافة يستعمل لغسلها محاليل منظفة وحفظها نظيفة فى كحول إيثايل ٩٠٪ ٠ والطريقة الآتية تعطى نتائج معقولة إذا ما أتبعت بكل دقة٠

التمرين العاشر

١ـ جهز مزرعة من البكتيره *Erwinia carotovora* ، وأخرى من *Agrobacterium tumefaciens* على آجار مائل٠ (عمر المزرعة يجب ألا يزيد عن ١٢ـ٢٤ساعة)٠

٢ـ أغمر سطح المزرعة بالماء المقطر، مع التحريك الخفيف٠

٣ـ انقل معلق الخلايا الخفيف جداً والمتكون بالأنبوبة إلى أنبوبة نظيفة أخرى ثم أترك الأنبوبة ١/٢ـ١ساعة، فى خلال ذلك الوقت يجرى تحضير الصبغتين أ، ب (أنظر قائمة الأصباغ والمحاليل بآخر الكتاب) ٠

٤ـ إنقل نقطة من معلق الخلاياإلى شريحة نظيفة(يلاحظ أن تأخذ النقطة من سطح المعلق حيث أن معظم الخلايا المتحركة تكون عند السطح)٠ضع الشريحة مائلة قليلاً لتتحدرنقطة معلق الخلاياعلىالشريحة مكونة غشاء ثم تترك الشريحة لتجف فى الهواء٠

٥ـ أغمر الشريحة بمحلول الصبغة (أ) لمدة ٦ـ٨دقائق٠

٦ـ تخلص من الصبغة على سطح الشريحة وذلك بصبها فى الحوض المعد لذلك ثم إغسل الشريحة بالماء المقطر (إذا لم تغسل الشريحة جيداً بالماء المقطر فإنه ستتكون ترسيبات غامقة تعيق الفحص الميكروسكوبى)٠

٧ـ أغمر الشريحة بالمحلول (ب) لمدة ٣٠ثانية٠ ثم إغسل أيضاً بالماء المقطر ٠

٨ـ أترك الشرائح لتجف فى الهواء٠

٩ـ ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحص ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية٠

١٠ـ صف وإرسم البكتيرات مبيناً شكل الخلايا وعدد ووضع الأسواط على خلاياها٠

صبغ الجراثيم Spore Staining

من المعروف أن الجراثيم الداخلية Endospores مقاومة بطبيعتها لتقبل الأصباغ فبالتالى لايمكن لطرق الصبغ العادية التى تستعمل فى صبغ الخلايا الخضرية للبكتيرات أن تؤدى إلى صبغها، لذلك يستعان بطرق أخرى تستغل الحرارة لتسهيل إدخال الصبغة خلال جدر الجرثومة،وبمجرد دخول الصبغة إلى داخل الجرثومة فإنها تثبت بها ويصعب إزالتها منها ،وهناك طرق عديدة لصبغ الجراثيم وفيما يلى وصفاً لطريقتين منها:

أولاً : طريقة شافر وفولتون : Shaeffer & Fulton

التمرين الحادى عشر (أ)

١ـ حضر غشاء من مزرعة *Bacillus subtilis* النامية على آجار مائل لمدة ٤٨ساعة ثم ثبته بتمرير الشريحة فى اللهب عدة مرات٠

٢ـ إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر سطح الشريحة بمحلول مائى لصبغة أخضر المالاكيت(٥٪) ، وسخن الشريحة بتعريض سطحها السفلى للهواء الساخن فوق مصباح بنزن حتى يتصاعد البخار منها دون أن تغلى الصبغة، إستمر فى عملية التسخين لمدة ٤ـ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة وذلك بإضافة مزيد من الصبغة كلما لزم الأمر٠

٣ـ إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم إغسلها بالماء٠

٤ـ أصبغ الغشاء بمحلول مائى للسفرانين لمدة دقيقة واحدة لصبغ الخلايا الخضريه٠

٥ـ أغسل محلول الصبغة بالماء٠

٦ـ أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء٠

٧ـ إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية٠

تظهر الجراثيم الداخلية خضراء فى حين أن الخلايا الخضرية وبقاياها المتصلة

بالجرثومة والتى يطلق عليها اسم الكيس الجرثومىSporangium تكون حمراء اللون. إرسم بعضاً من الخلايا الخضرية والجراثيم مبيناً شكلها ووضع الجرثومة من الخلية الخضرية (طرفى، تحت طرفى، وسطى) وحجمها (مساوى أو أقل أو أكبر من قطر الخلية الخضرية).

ثانيا : طريقة Dorner

التمرين الحادى عشر (ب)

١- حضر معلق كثيف من خلايا البكتيره *Bacillus subtilis* فى ٢-٣ نقطة من الماء فى أنبوبة إختبار صغيرة.

٢- أضف كمية مماثلة من كربول الفوكسين المرشح حديثاً إلى معلق الخلايا.

٣- ضع المخلوط فى حمام مائى (١٠٠ °م) لمدة ١٠ دقائق.

٤- إخلط نقطة بسيطة من الخلايا المصبوغة مع نقطة صغيرة من محلول النيجروسين المشبع على شريحة نظيفة (هذا المحلول يجب أن يرشح قبل الإستعمال) ثم تفرد على الشريحة بحيث يتكون غشاء رقيق.

٥- أترك الغشاء ليجف ويفضل أن يجف الغشاء بسرعة وذلك بتعريض الشريحة للهواء الساخن فوق لهب بنزن.

٦- إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملاً العدسة الزيتية. الجراثيم تظهر حمراء اللون أما الخلايا الخضرية والكيس الجرثومى Sporangium فتكون شفافة فى وسط رمادى أو أسود.

صف وإرسم البكتيره مبيناً شكل وحجم الجراثيم ومواضعها من الخلايا الخضرية التى تحملها.

الصبغة السالبة Negative Stain

راجع الدراسات المجهرية بالحقل المظلم والتمرين الثانى.

القياسات المجهرية

عندما تزود العدسة العينية بقرص يوضع فى مكان مخصص له داخل العينية بعد فتحها وهذا القرص مدرج تدريجاً دقيقاً ويعرف بالميكروميتر العينى Ocular micrometer فإن الفاحص يمكنه أن يجرى قياسات دقيقة بعد معايرة أقسام الميكروميتر العينى بالإستعانة بالميكروميتر الشيئى المدرج تدريجا معلوما وتتم بها قياس البكتيريات كما سيأتى فيمابعد وتعتبر هذه القياسات (طول أو عرض) من الصفات التقسيمية الهامة للكشف عن التنوعات أو الإختلافات التى تطرأ على طول وعرض الكائن الدقيق إذا ما حدث ما يدعو إلى ذلك من ظروف بيئية، وهى أيضاً تتبع القياس حجم الجراثيم التى ينتجها الكائن سواء كانت داخلية أم خارجية وكذلك فى قياس الحوامل الجرثومية إن وجدت وشكل ١٢ يبين التدريجات التى تشاهد فى العدسة العينية للميكروميتر العينى وكذلك تلك التى تشاهد على الميكروميتر الشيئى Stage micrometer وأخرى تبين تطابق التدريجين والتعرف على هذه التطابقات كمياً،

التمرين الثانى عشر

١ـ يوضع الميكروميتر العينى فى العدسة العينية وذلك يفصل الجزء العلوى منها ثم يوضع الميكروميتر بأنبوبتها مرتكزاً على المكان المخصص له ثم يعاد تركيب الجزء العلوى من العدسة إلى مكانه،

٢ـ ضع الميكروميتر الشيئى Stage micrometer وهو عبارة عن شريحة على مسرح الميكروسكوب ثم حاول مشاهدة تقسيماتها بالعدسة الصغرى (التدريجات توجد بداخل دائرة سوداء)، ثم ثبت الشريحة بالماسكين،

٣- حرك القطعة الأنفية للمجهر لتجهز الشيئية الكبرى للإستعمال حرك الضابط الدقيق حتى ترى التقسيمات بوضوح.

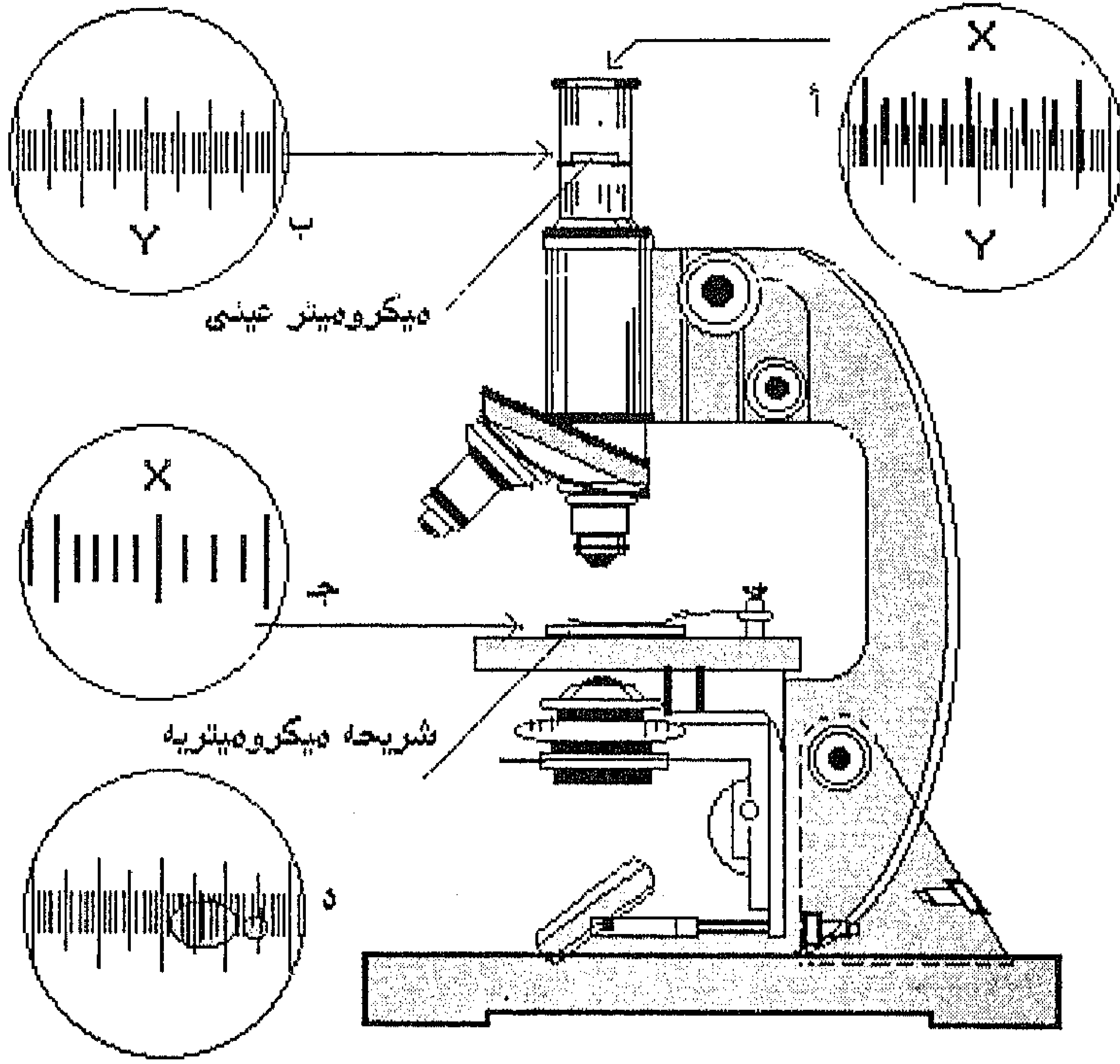
٤- ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية ثم حرك القطعة الأنفية لتستحضر العدسة الزيتية. حرك الضابط الدقيق حتى تنغمس الشريحة وترى أقسام التدريجين .

٥- حدد عدد أقسام الميكروميتر العينى المساوية لعدد أقسام الميكروميتر الشيئى (يلاحظ ضرورة إنطباق خطوط التدريجين على أبعد مسافة ممكنة) قدر عدد أقسام الميكروميتر العينى التى تقابل عدد أقسام الميكرومتر الشيئى فى المنطقة المختارة.

٦- وعادة يكون مسافة القسم الواحد من أقسام الشريحة الميكرومترية (الشيئيه) مدوناً عليها وهو فى غالبية الأحوال يكون مساوياً ٠١, من المليمتر أى ١٠ميكرون وعلى ذلك يمكن تقدير طول التدريج الواحد من الميكروميتر العينى بإستعمال العدسة المغمورة بالزيت وإذا تساوى ٣ أقسام من الميكروميتر الشيئى مع عدد ٢٠جزء من الميكروميتر العينى فالقسم الواحد من العينية = ٠١×٣, /٢٠= ٠٠١٥, ملليمتر أو ٥, ١ ميكرون.

٧- إرفع الشريحة ونظفها جيدا من الزيت وإحفظها فى مكانها المخصص ثم ضع الشريحة المراد دراستها مكانها وعليها نقطة من زيت السيدر وحرك الضابط الدقيق حتى ترى ما تود قياسه.

٨- حدد طول الجراثيم أو الخلايا بتقدير عدد أقسام الميكروميتر العينى المساوى للجزء المراد قياسه.



شكل ١٢: يوضح كيفية أجراء عملية معايرة أقسام الميكروميتر العينى٠

أ – بداية المعايره ويلاحظ كل من تدريج الميكروميتر العينى (Y) وندريج الميكروميتر الشيئى(X)٠

ب ـ تدريج الميكروميتر العينى٠

جـ ـ تدريج الميكروميتر الشيئى٠

د ـ قياس العينة٠

تنمية البكتيرات

هناك مجالاً متسعاً من الإحتياجات الغذائية للبكتيرات المختلفة فبعضها يحتاج إلى بيئات غنية بالمواد الغذائية والبعض الآخر له متطلبات بسيطة من المواد غير العضوية وماذلك إلا للإختلافات فى قدراتها التخليقية للمواد العضوية اللازمة لتغذيتها• ومنها مايحتاج إلى كميات كبيرة من الأكسجين والبعض الآخر يهلك فى وجود الأكسجين وذلك لإختلاف قدراتها التأكسدية الإختزالية• ولهذا التباين الملحوظ فى إحتياجات هذه الكائنات من الغذاء والهواء فقد أوجد الباحثين طرقاً عديدة لتنمية هذه الكائنات بالمعمل كل طريقة منها تلائم كل مجموعة أو نوع من هذه الكائنات ولكى تنمى البكتيرات بالمعمل استعملت مخاليط أطلق عليها اسم البيئات media ومفردها بيئه medium تحتوى على الإحتياجات الغذائية اللازمة لتنمية كل مجموعة حسب إحتياجاتها من الغذاء وهذه البيئات إما أن تكون سائلة أو صلبة أو شبه صلبة عند إضافة مواد تصلبية إليها•

الإحتياجات الغذائية:

للحصول على أفضل نمو لكل مجموعة بكتيريه يجب أن نتفهم إحتياجاتها الرئيسية من الغذاء• والمتطلبات الغذائية للكائنات عموما تتلخص فى (الماء ،الكربون، الطاقة، النيتروجين، المعادن وعوامل النمو) وفيما يلى مناقشه كل منها :

الماء : إن بروتوبلازم الخلية الحية يحتوى من ٧٣ــ٨٠٪ من الماء- والماء اللازم للكائنات ذات الخلية الواحدة تحصل عليه من البيئة الطبيعية التى تعيش عليها• والماء يدخل من الخلية محملاً بكل الجزيئات الغذائية الذائبة بالبيئة الطبيعية ويخرج منها محملاً بما تريد أن تخرجه الخلية وكل العمليات الإنزيمية

الكيماوية التى تتم بداخل الخلية تتم فقط فى وجود كميات كافية من الماء ،ونوعية الماء اللازم لتحضير بيئة لتنمية البكتيرات يعتبر من الأمور الهامة جداً ، فمثلاً يجب عدم إستعمال ماء الصنبور العسر أو المحتوى على أيونات الكالسيوم أو الماغنيسيوم ، حيث أن وجود الفوسفات غير الذائبة وكذلك أيونات الكالسيوم أو الماغنيسيوم قد تؤثر على مدى صلاحية البيتون او خلاصة اللحم التى تضاف إلى البيئة ، وأفضل المياه التى تستعمل فى صناعة بيئات الزرع هو الماء المقطر ،

الكربون : تنقسم البكتيرات إلى مجموعتين رئيسيتين فيما يختص بمصدر الكربون ، مجموعة تستعمل الكربون الموجود فى صورة ثانى أكسيد الكربون لبناء إحتياجاتها من المواد الكربونية المعقدة وهذه تعرف بذاتية التغذية autotrophs أما المجموعة الثانية فهى تحتاج واحد أو أكثر من المواد العضوية للحصول على إحتياجاتها من الكربون وهذه تعرف بغير ذاتية التغذية heterotrophs وبعض أفراد المجموعة الأخيرة هذه تحتاج علاوة على المواد الكربونية العضوية إلى ثانى أكسيد الكربون أيضاً فإذا منع هذا الغاز عنها كلية يتوقف نموها وخاصة فى مراحل نموها الأولى والمواد العضوية الكربونية عديدة ومتنوعة كتنوع الكائنات البكتيرية نفسها ، فعندما يحتاج كائن بكتيرى إلى مركب واحد من المواد الكربونية العضوية مثل حمض الخليك مثلاً فإن هناك كائن آخر قد يحتاج إلى العديد من المركبات العضوية على درجات مختلفة من التعقيد فى تركيبها الكيماوى ،

الطاقة : البكتيرات المحتوية على صبغات تجعلها ذات قدرة على إستغلال الطاقة الشمسية يطلق عليها ذاتية التغذية ممثلة للضوء photoautotrophs أو photosynthetic autotrophs ، وعمل بيئات غذائية لتنمية هذا النوع من

البكتيرات لاتحتوى على أى مصدر للطاقة ،والبكتيرات ذاتية التغذية التى لاتستطيع الإستفادة من الطاقة الشمسية ولكنها تؤكسد مواد غير عضوية بسيطة تعرف بذاتية التغذية كيماوياً Chemoautotrophs أو Chemosynthetic autotrophs ، والمواد الضرورية المنتجة للطاقة لمثل هذه الكائنات تكون إما نيتريت أونترات أو كبريتات،

معظم البكتيرات تقع فى مجموعة غير ذاتية التغذية كيمائياً (Chemosynthetic heterotrophs) ، وهذه المجموعة تتطلب مصدراً عضوياً مثل الجلوكوز أو الأحماض الأمينية، والكمية من المواد المنتجة للطاقة اللازم إضافتها لبيئات زرع البكتيرات ذات التمثيل الكيماوى بنوعيها تقدر بما لايزيد عن ٥, ٪، وهناك عدد قليل من البكتيرات يعرف بالبكتيرات غير ذاتية التغذية والممثلة للضوء photosynthetic heterotrophs أو photoheterotrophs ، وهذه الكائنات تحتوى على صبغات تمثل الطاقة الشمسية أوالضوئية للحصول علىالطاقة ولكن يجب أن تحصل أيضاً على مصدراً عضوياً من الكربون مثل الكحول مثلاً،

النيتروجين : بالرغم من أن البكتيرات ذاتية التغذية يمكنها إستعمال مصادر غير عضوية من النيتروجين فإن البكتيرات غير ذاتية التغذية تحصل على حاجتها من النيتروجين من الأحماض الأمينية ومن المواد الوسطية فى تحلل البروتينات مثل الببتيدات والبروتيوزات والببتون، ومستخلص اللحم والببتون والتى تستعمل فى تحضير بيئات الزرع مثل المرق المغذى توفر النيتروجين اللازم لمعظم البكتيرات غير ذاتية التغذية التى تنمو عليها،

المعادن : كل الكائنات الحية بما فيها البكتيرات تحتاج إلى كميات ضئيلة من الأيونات المعدنيةمثل الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنيسيوم

والمنجنيز والحديد والزنك والنحاس والفوسفوروالكوبلت لكى تنموطبيعياً وكما سبق القول أن الكميات اللازمة منها قليلة جداً•وهذه المعادن قد تدخل فى عمليات البناء أوالتنفس أو تعمل كمرافقات إنزيمية•

عوامل النمو : إن أى مادة حيوية وضرورية لبناء وحياة الخلية والتى لا تقدر الخلية على تخليقها بنفسها من المصادر الكربونية والنيتروجينية البسيطة التى تتناولها تعرف بعوامل النمو •وهذه تشمل فيتامينات وأحماض أمينية معينة•

والكثير من البكتيرات غير ذاتية التغذية تكتفى بما يحتويه مستخلص اللحم المضاف فى بيئة المرق المغذى من عوامل النموإلا أن هناك بعض البكتيرات الممرضة الصعبة التنمية Fastidious heterotrophs تحتاج إلى بيئات أغنى غذائياً enriched مثل اجار الدم للحصول على العديد من عوامل النمو التى يحتاجها •

تركيز أيون الأيدروجين Hydrogen Ion Concentration : إن نمو أى كائن بكتيرى يتوقف إذا لم تكن قيمة pH للبيئة فى حدود معينة• هذا وأن النظم الإنزيمية فى الخلية البكتيرية تتأثر كثيراً بقيمة pH البيئة• وحيث أن معظم البكتيرات تنمو جيداً على بيئات ذات الـpH حول pH ٧ ،أو أقل قليلاً فإن قيمة pH البيئة المحضرة مثل بيئةالمرق المغذى يجب أن يضبط على ٦,٨ pH• والكائنات الممرضة للإنسان والحيوان تفضل بيئات ذات قيمة pH تميل إلى القلوية•

أنواع بيئات الزرع

١ـ بيئات محددة التركيب الكيماوى Chemically defined media

وتعرف أحياناً بالبيئات التركيبية Synthetic medium وتتكون من مواد ذات تركيب كيماوى معروف ، كأملاح غير عضوية ومركبات عضوية بسيطة على مستوى مرتفع من النقاوة ونظراً لأن مكوناتها تكون من نوعية معروفة ومشهود بتفاوتها فبذلك يمكن تكرار تحضيرها بالدقة المعتادة فى كل مرة من مرات التحضير ولعل ذلك من أهم مميزات هذا النوع من البيئات وإستعمالها بإستمرار فى دراسة الإحتياجات الغذائية الأخرى التى قد تضاف إليها لتنمية البكتيرات ومثل هذه البيئات قد تباع بالأسواق مجهزة فى صورة مسحوق يذاب كمية محددة منه إلى لتر من الماء المقطر للحصول على بيئة سائلة أو بيئه قابلـه للتصلب ،

٢ـ بيئات غير محدودة التركيب الكيماوى Chemically non defined media.

ويطلق عليها أيضاً بيئات غير تركيبية.non synthetic media تتكون من مكونات غير معروف التركيب الكيماوى لهاعلى وجه الدقه فكل من مستخلص اللحم والببتون على سبيل المثال والتى تدخل فى تصنيع بيئة المرق المغذى لازال تركيبهما الكيماوى غير معروف على وجه الدقه فهذا التركيب الكيماوى يختلف بإختلاف المصادر الطبيعية المستعملة فى تحضيرها فلذلك كان من الصعب تكرار تحضير هذه البيئات بنفس التركيب وبنفس الدقة ،

٣ـ البيئات المجففة Dehydrated media

كان الدارسين فيما مضى يضيعون كثير من الوقت فى تجهيز بيئات زرع البكتيرات لأنهم كانوا يستخلصون بأنفسهم المواد الأولية المختلفة التى تدخل فى تركيب البيئات ،

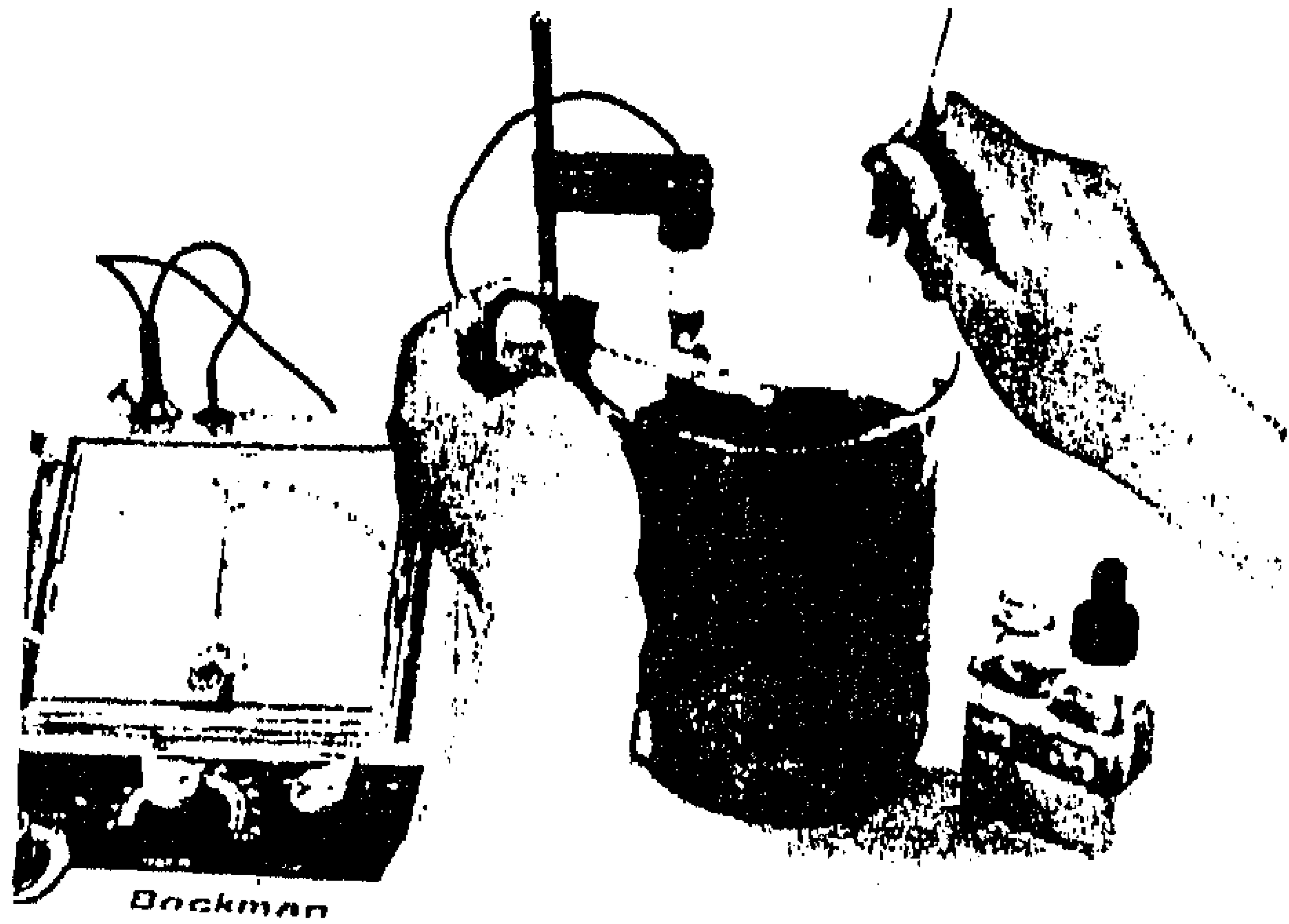
فإذا ما إحتوت البيئة على خمسة أو ستة مكونـات فكـان علـى الـدارس تحضـير البعـض منهـا بنفسـه مثـل مسـتخلص اللحـم أو مسـتخلص البطـاطس أو مسـتخلص الخمـيرة وهـذه تتطلـب طـرق طويلـــة ومجهـدة ، والآن فإنـه توجـد بالأسواق جميع أنواع بيئات الزرع مجففة dehydrated • فأصبح تجهيزها للعمل من الأمور الميسرة ويلاحظ على كل عبوة من هـذه البيئـات المكونـات الرئيسـية لها والتعليمات الخاصة بتحضيرها فما علـى البـاحث إلا أن يضيـف كميـة المـاء المقطر على الكمية المقررة من المسحوق ثم يقاس قيمة الـ pH ليتـأكد منـه وهـو عادة ما يكون محسوباً ومضبوطاً ثم يصب البيئة فى الأنابيب أو الدوارق لتعقم•

وتباع بالأسواق كل أنـواع البيئـات مجففـة والتـى يتطلبهـا البحـث مثـل بيئات الحد الأدنـى، بيئـة المـرق المغذى، الآجـار المغـذى والجلوكـوز، البيئـات الإنتخابيـة Selective media التـى يكـون مضافـاً إليهـا أنـواع معينـة مـن المـواد الكيماوية لمنع تنمية مجموعة معينة مـن البكتـيرات والسـماح للمجـاميع الأخـرى وكذلك البيئات التفريقية Diffrential media مثل بيئة اجار الدم والتى تفـرق بيـن البكتـيرات المحللـة للهيموجلوبيـن عـن غيرهـا• وكذلـك بيئـات التقديـر الحيـوى للفيتامينات Vitamin assay media وبيئات تقدير أعداد الخلايا البكتيريـة وبيئـات التعرف على البكتيرات وغيرها•

وقد تكون البيئة المجففة مجهزة لتحضير بيئة سائلة أو مجهزة لتحضـير بيئة صلبة والأخيرة يكون مضافاً إليها الآجار آجار بالنسبة المقررة وهـى عـادة ٢٪ أو مضافـاً إليهـا حمـض السلسليك بالنسبة المقـررة لتحديد الشـكل الهلامـى المتصلب على درجـة حـرارة الغرفـة أو شبه صلبـة بإضافـة الجيلاتيـن بالنسبـة المقررة أيضاً•

ضبط قيمة pH البيئة

بالرغم من أن كل البيئات المجففة والمجهزة تكون محتوية على عوامل تنظيمية للحموضة Buffering aqeul إلا أن قيمة pH البيئة المحضرة منها تكون مختلفة عن تلك المبينة على بيانات العبوة٠ لذلك فقبل أن تعبىء البيئة فى الأنابيب أو الدوارق عليك بتقدير قيمة الـpH لها٠ ثم يجرى لها ضبط للدرجة المرغوبة٠ وتستعمل لذلك جهاز قياس pH إلكترونى والذى يجب أن يختبر بالإستعانة بمحلول Buffer معروف قيمة الـpH له ثم يعدل قيمة pH البيئة بإضافة محلول من الصودا الكاوية قوة واحد أساسى إذا أريد زيادة الـpH نقطة نقطة مع التقليب أو محلول من حمض الهيدروكلوريك واحد أساسى نقطة نقطة إذا أريد تقليل قيمة pH ، وتقرأ القيمة بالجهاز بعد إضافة نقطتين من أى من المحلولين فى المرة الواحدة٠ حتى تنضبط قيمة pH (شكل ١٣)٠



شكل ١٣ : قياس تركيز أيون الأيدروجين بالبيئه بعد ضبته
بإضافة عدة نقط من الحمض أو القلوى مع التقليب المستمر٠

التمرين الثالث عشر (أ)

أولاً : تحضير لتر من بيئة المرق المغذى

١ـ ضع ٣جم مستخلص لحم +٥جرام مسحوق ببتون فى وعاء زجاجى نظيف ،

٢ـ أضف لتر ماء مقطر للمكونات السابقة فى الوعاء مع خلطها جيداً حتى الإذابة ،

٣ـ أسحب بواسطة ماصة كمية ١٠مل من البيئة وقدر قيمة الـpH بها ، قدر الكمية اللازمة من الحمض أو القلوى اللازمة لضبط الـ pH فى ٩٩٠مل من البيئة ثم أضف الكمية من الحامض أو القلوى اللازمة لضبط الـpH إلى ٧,٢ ،

٤ـ صب البيئة فى أنابيب أو دوارق مناسبة بإستعمال قمع التعبئة ،

٥ـ غطى الأنابيب أو الدوارق بسدادات من القطن أو المعدن أو البلاستيك حسب ما يتوفر لديك بالمعمل ،

٦ـ ضع الأنابيب فى الأسبته السلكية الخاصة بها ،

٧ـ ضع الأسبته فى الأوتوكلاف بعد التأكد من طريقة إستعماله ثم عقم الأنابيب لمدة ٢٠ دقيقة على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١٥ رطل/البوصة المربعة ،

٨ـ بعد إنتهاء المدة المقررة إقفل الأوتوكلاف وأترك الضغط ينخفض إلى الصفر ثم إفتحه وإستخرج محتوياته ،

التمرين الثالث عشر (ب)

ثانياً : تحضير لتر من بيئة الآجار المغذى

١ـ حضر بيئة المرق المغذى بالطريقة السابقة٠

٢ـ بعد ضبط قيمة الـ pH إلى ٧,٢ أضف ٢٠ جم من مادة الآجار آجار* ثم ضع الوعاء على حمام مائى على درجة ١٠٠°م حتى يتم إنصهار الآجار٠

٣ـ عبىءالبيئة فى أنابيب بواسطة قمع التعبئة (يراعى السرعة حتى لاتتصلب البيئة على القمع وتسده) كما يراعى ملىء٣/٢ الأنبوبة إذا أريد الحصول على آجارعميق deep٠ أو ٣/١ الأنبوبة إذا أريد الحصول على آجار مائل slanted كما يمكن تعبئتها فى دوارق أو زجاجات أيضاً٠

٤ـ تسد الأنابيب كالمعتاد وتوضع فى الأسبته٠

٥ـ تعقم فى الأوتوكلاف كما سبق فى تحضير المرق المغذى٠

٦ـ بعد إخراج الأنابيب المعدة لعمل الآجار المائل تمال الأنابيب وتوضع قممها على جزء مرتفع للحصول على السطح المائل ويراعى أن لاتصل البيئة إلى السدادات القطنية وتترك لتتصلب فى هذا الوضع٠

---

*تضاف مادة الآجار آجار كمادة تصلبية فى هذه البيئة وهى تسال على درجة الغليان ثم تتصلب على درجة ٤٢°م ٠ وهو عبارة عن مادة كربوأيدراتية تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء من نوع Gelidium – وغالبية الكائنات لاتحلله كما أنه لايتأثر بدرجة حرارة التعقيم بالأوتوكلاف إلا إذا كان تفاعل البيئة شديد الحموضة أو القلوية٠

الصفات المزرعية Cultural characteristics

تشمل الصفات المزرعية للكائن البكتيرى المظهر المرئى بالعين المجردة للنمو فوق أو فى بيئات الزرع المختلفة٠ هذا والصفات المزرعية التى إعتمدها مرجع بيرجى يجب أن تدرس وتوصف لكل كائن بكتيرى يراد التعرف عليه٠ والبيئات المعتمدة للدراسات المزرعية هذه هى بيئتى الآجار والمرق المغذى وكذلك الجيلاتين المغذى٠ولدراسة بعض البكتيرات المجهولة وخصوصاً المعزولة من الأنسجة الحيوانية يستحسن إضافة بيئة آجار الدم ٠

أولا : النمو على بيئة الآجار المغذى المائل

لاحظ ما يلى كما فى شكل ١٤ ودونه ٠

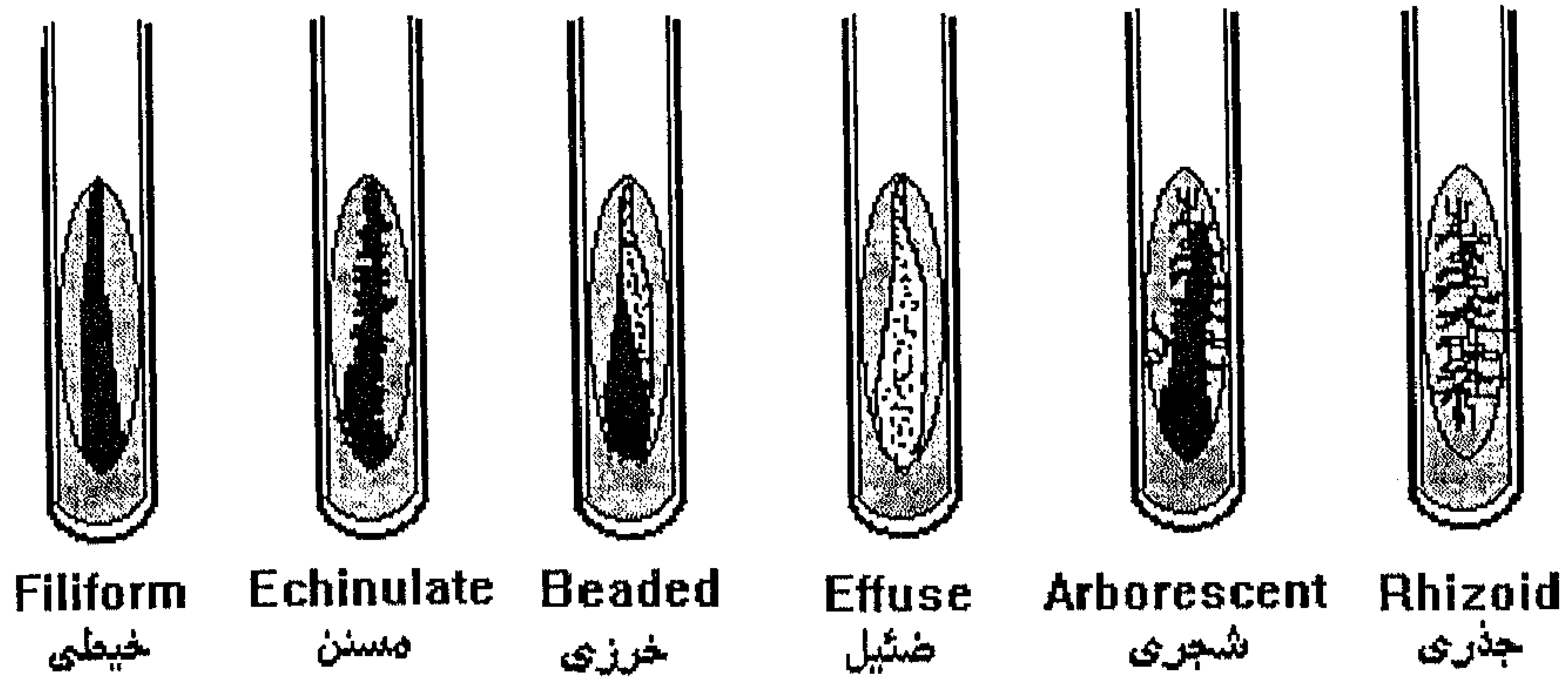
١ــ كمية النمو فوق الآجار المائل : وهى إما أن تكون خفيفة أو متوسطة أو غزيرة أو لايوجد نمو على الإطلاق٠

٢ــ لون النمو : يجب ملاحظة الصفات المصاحبة للنمو كاللون إما داخل البيئة نفسها أو على النمو فقط- معظم البكتيرات يظهر نموها باللون الأبيض والبعض الآخر قد يبدى درجات مختلفة من التلوين- بعض البكتيرات تكون صبغات قابلة للذوبان فى الماء تنتشر فى البيئة٠ لذلك يجب أن توضع المزرعة أمام ضوء قوى للبحث عن الصبغات المنتشرة فى البيئة٠

٣ــ الشفافية : الكائنات التى تنمو بغزارة على الآجار المائل تبدو معتمة عن تلك التى تعطى نمواً خفيفاً، ودرجة الشفافية يمكن أن توضح كالآتى:-

معتم – شفاف- شفاف جزئياً trauslucent ٠

٤ــ الأشكال المختلفة لقوام النمو موضحة فى الشكل الآتى (شكل ١٤)٠



شكل ١٤ـ الأشكال المختلفة للنمو على الآجار المائل.

النمو الخيطى Filiform يتميز بإنتظام النمو على طول خط التلقيح.

النمو المسنن Echinulate حواف النمو تظهر بموجات مسننة.

النمو الخرزى Beaded مستعمرات صغيرة منفردة أو شبه متصلة على طول خط التلقيح.

نمو ضئيل Effuse النمو خفيف بشكل نقط صغيرة منتشر بدرجة غير منتظمة.

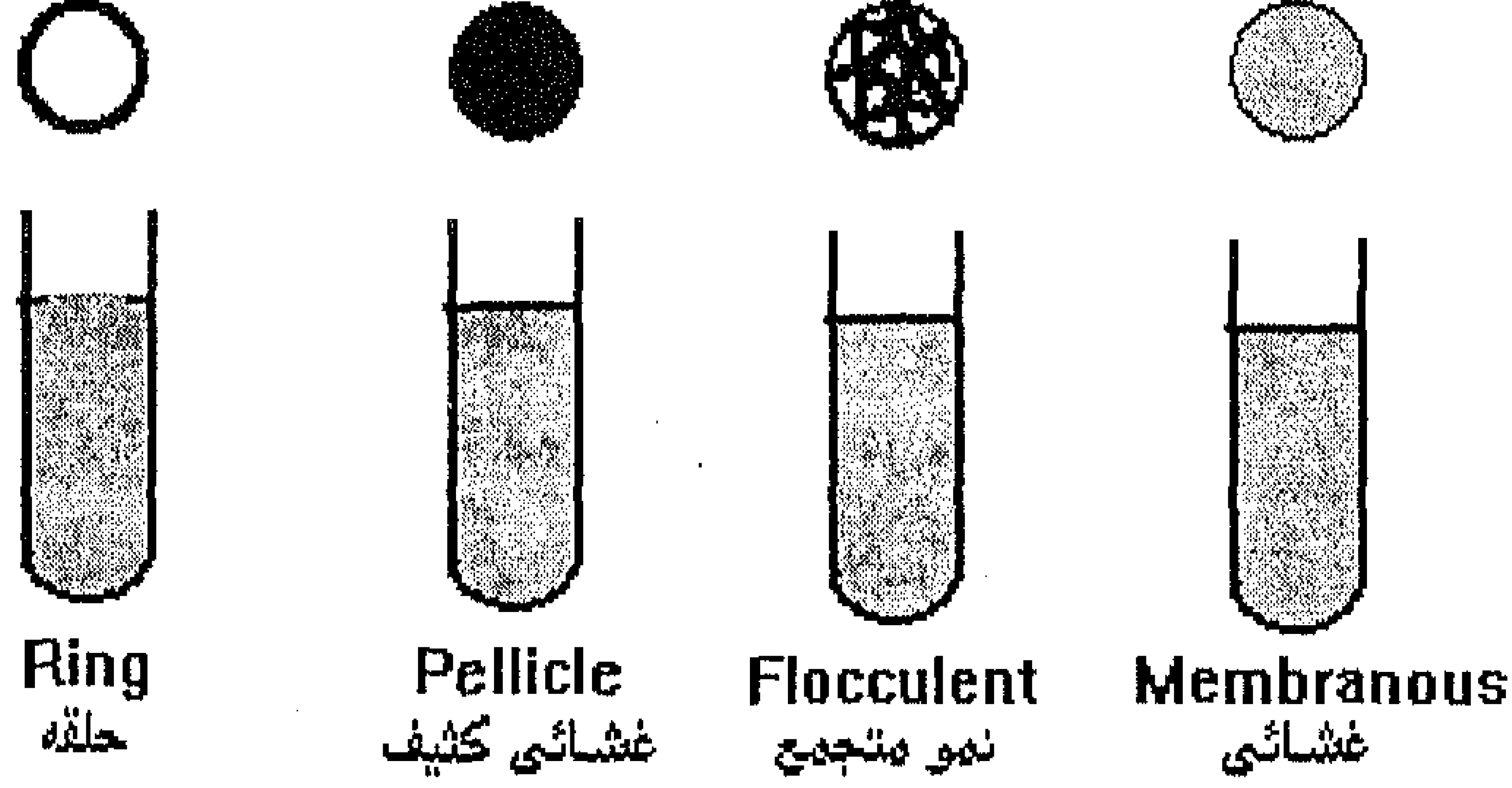
نمو شجرى Arborescent نمو بكتيرى (يشبه جذع الشجرة) يخرج منه تفرعات تشبه أفرع الأشجار.

نمو جذرى Rhizoid النمو البكتيرى يشبه تفرعات الجذور النباتية.

ثانياً : النمو على بيئة المرق المغذى

يلاحظ طبيعة النمو على سطح البيئة وعلى المنطقة تحت السطحية وكذلك النمو فى قاع البيئة وذلك لتحديد الإحتياجات الأكسوجينية و هى كما يلى :

١ـ سطح المزرعة فيما يلى (شكل١٥) يبين أشكال النمو السطحى على البيئة السائلة ٠



شكل ١٥: النموات السطحية على البيئة السائلة بالأنابيب .

٢ـ تحت السطح يمكن وصف تحت سطح البيئة السائلة بأنه عكر أو يكون حبيبى granular إذا ما شوهدت جزيئات صغيرة عالقة به،أو طيفى إذا ما شوهدت أجسام عائمة كبيرة الحجم تتحرك تحت السطح (flocculent)، أو صفيحى flaky إذا شوهدت صفائح صغيرة عائمة به٠

٣ـ الرواسب (قاع الأنبوبة) إن كمية الرواسب فى قاع الأنبوبة تختلف بين غائبة أو غزيرة ولكى توصف هذه الرواسب ترج الأنبوبة بترك الرواسب لتنتقر ويمكن وصف الرواسب حبيبية granular، طيفية flocculent أو صفيحى flaky أو لزجة Viscid ولإختبار الكثافة (اللزوجة) يحرك الراسب بإبرة تلقيح معقمة ٠

ثالثاً: تقدير كمية النمو على البيئة السائلة:

لإجراء ذلك يجب رج الأنبوبة لنشر النمو ثم تقدر كمية النمو بأنها خفيفة- متوسطة- غزيرة٠

رابعاً: النمو فى بيئة الجيلاتين العميق Gelatin stap culture

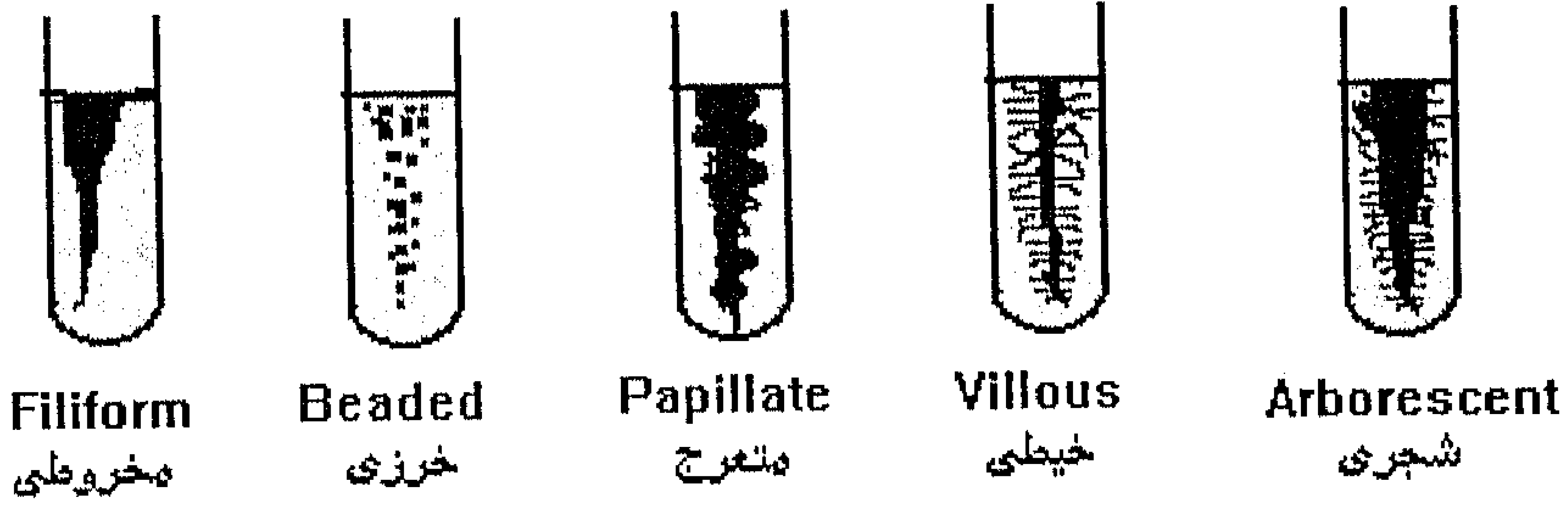
إذا ما حدث نمو فى بيئة الجيلاتين المغذى العميق فإننا نبحث عن أمرين :

أ- نوع النمو وشكله ٠

ب - حدوث إسالة للجيلاتين من عدمه وذلك بعد تبريد الأنبوبة لمدة ٥ دقائق حتى لاتكون الإسالة ناتجة عن إرتفاع درجة الحرارة٠

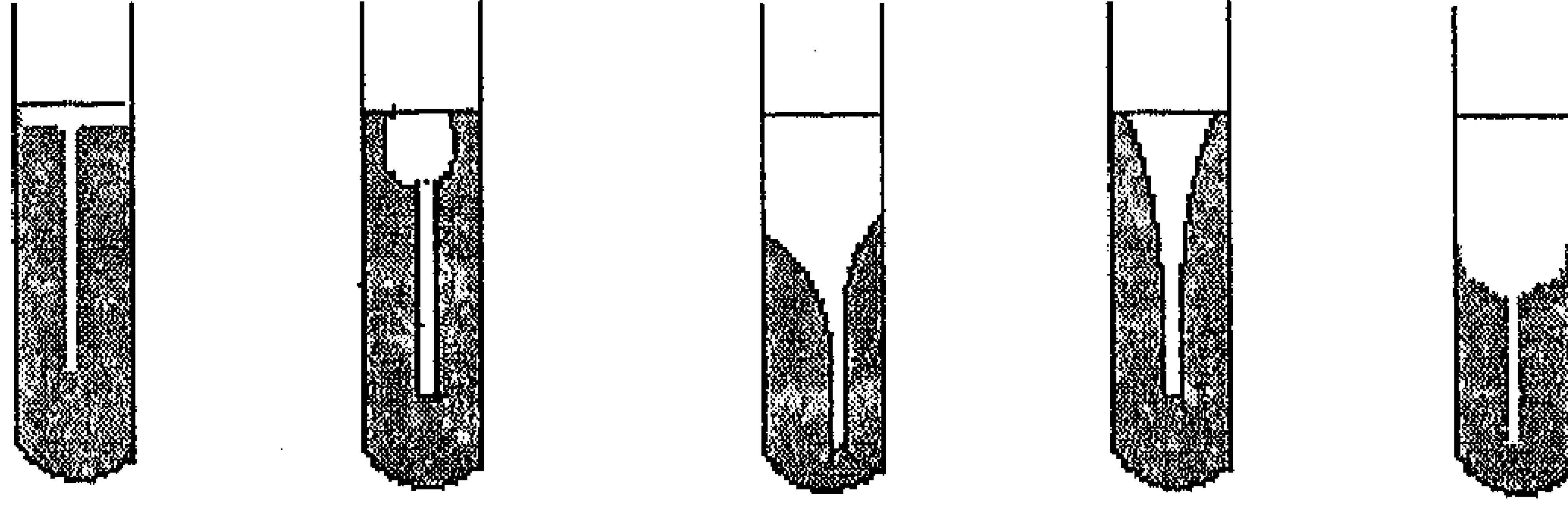
أ- نوعية النمو بصرف النظر عن الإسالة :

لايمكن لكل البكتيرات أن تنمو على بيئة آجار الجيلاتين ولكن إذا حدث نمو بدون إسالة للجيلاتين فقد يظهر كواحد من الأشكال الآتية: (شكل ١٦)



شكل ١٦: الأشكال المختلفة من النمو البكتيرى فى بيئة جيلاتين عميق ملقح بالوخز(فى حالة عدم حدوث التحلل).

ب - بعض البكتيرات تفرز إنزيم gelatinase والذى له القدرة على هضم الجيلاتين وتحليله وعندما يتحلل الجيلاتين فى البيئة فإنها تفقد تماسكها ويحدث لها الإسالة له بجملة أشكال كما هو مبين بشكل (١٧)٠



شكل ١٧: أنواع تحلل أو إسالة الجيلاتين .

الطبقى crateriform إسالة بشكل طبق الفنجان ،

اللفتى Napiform إسالة بشكل جذر اللفت ،

القمعى Infundebuleform إسالة بشكل القمع ،

زقى أو Saccate إسالة بشكل الجيب أو الكيس الطويل ،

الكأسى Stratiform إسالة لكل الجيلاتين تبدأ من جدر الأنبوبة إلى أسفل ، إذا حدث ولم يقم النوع البكتيرى بإسالة الجيلاتين ضع الأنبوبة بالحضان ثانية لمدة ٤-٥أيام فقد تحدث إسالة ثانوية ،

خامساً : النمو على بيئة الآجار بالأطباق

إن المستعمرات التى تنموعلى سطح بيئة الآجارالمغذى يجب أن تدرس أيضاً من ناحية لونها، شفافيتها، قوامها، إرتفاعها، عن سطح البيئة وشكل حوافها ، أنظر إلى (شكل ١٨أ ، ب) ،

التمرين الرابع عشر

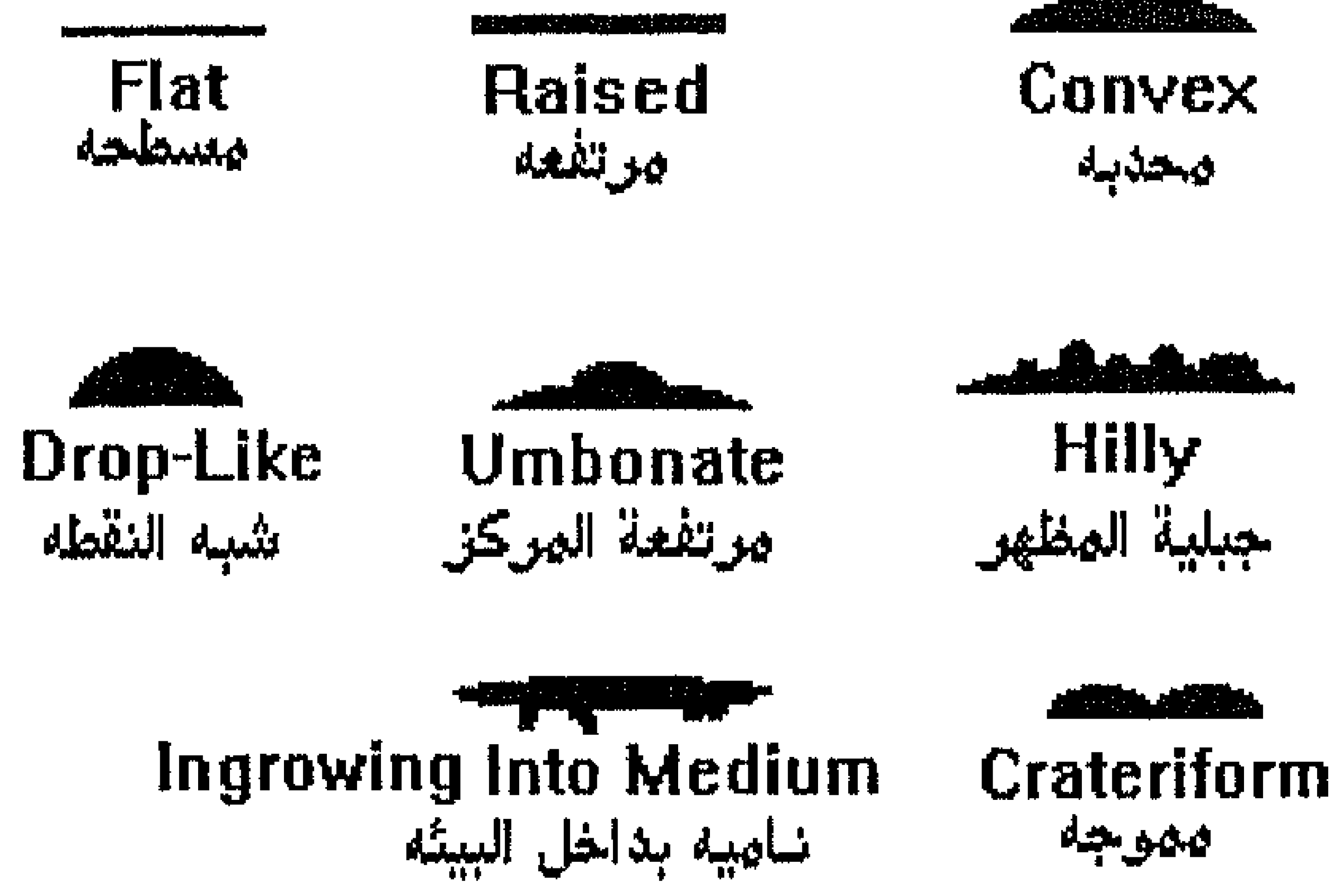
١- أفحص المستعمرات النامية بالأطباق التى أمامك ،

٢- أفحص النمو البكتيرى على بيئتى المرق والآجار المغذى ،

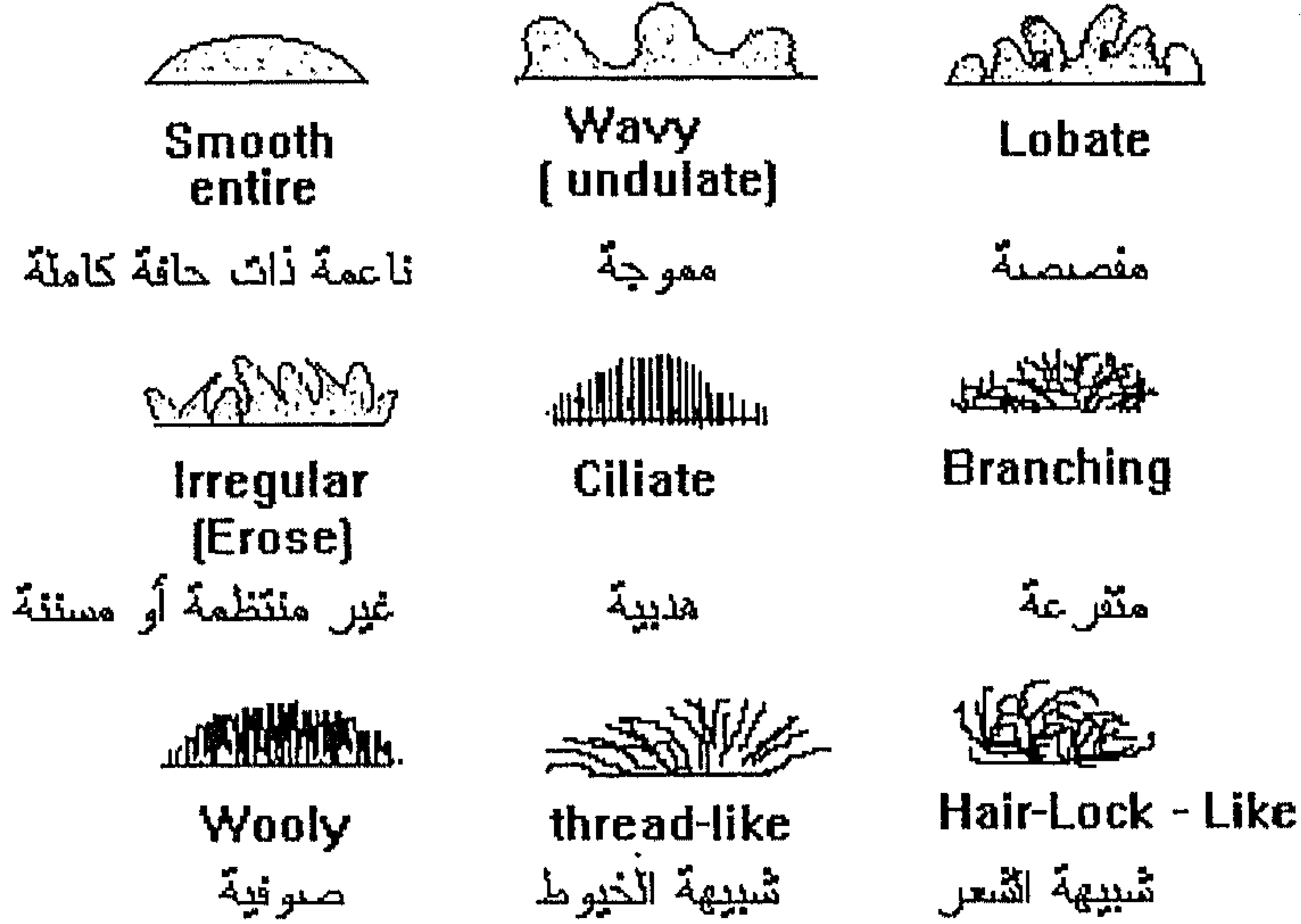
٣- أفحص النمو البكتيرى فى بيئة الجيلاتين العميق ،

٤- دون ملاحظتك مع الرسم بالأستعانة بالأشكال التالية ،

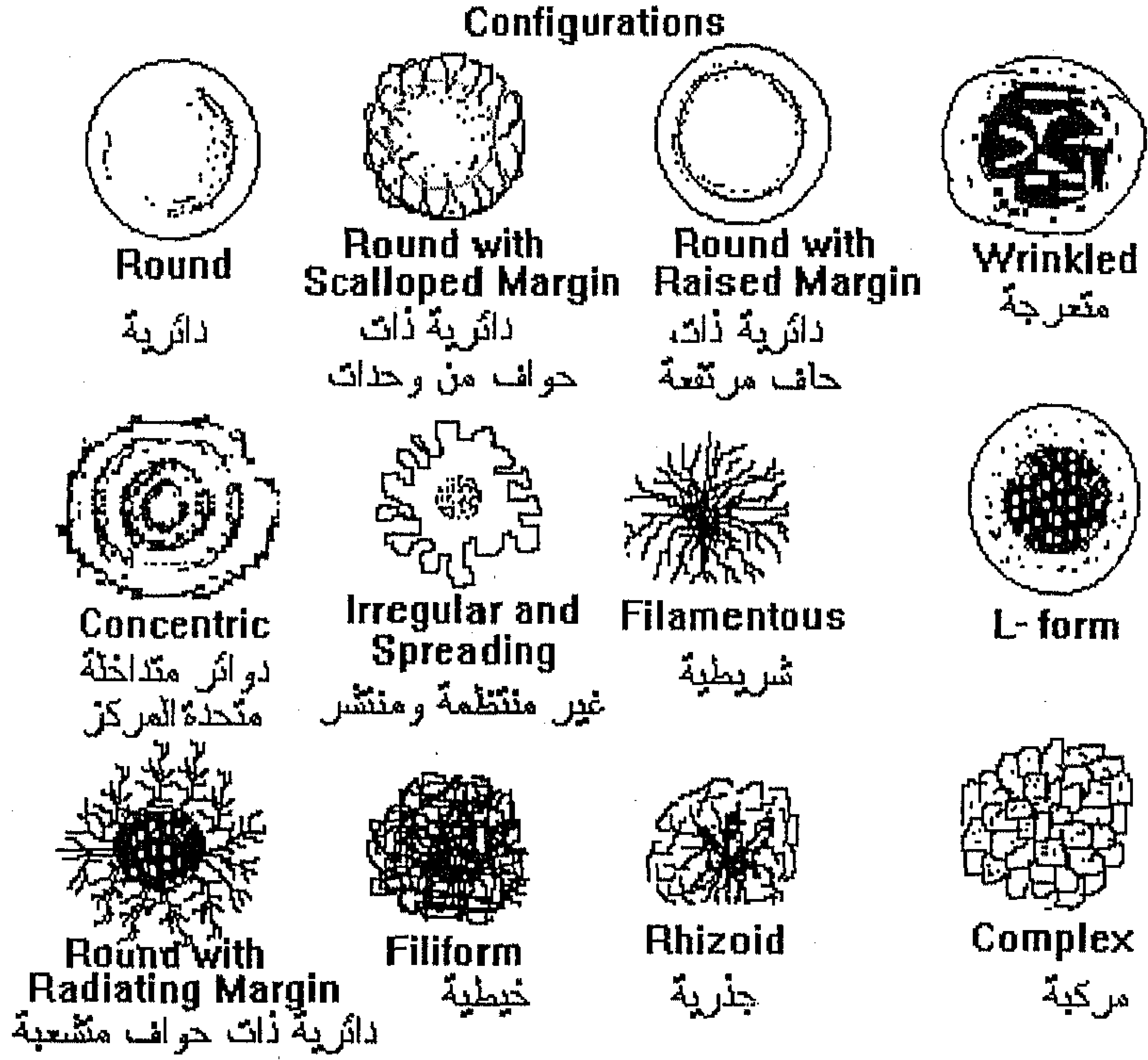
Elevations الأرتفاع



Margins الحواف



شكل ١٨أ : الأشكال المختلفة لارتفاع وحواف مستعمرات البكتيرات النامية على بيئة آجار بالأطباق .



شكل ١٨ب : الأشكال المختلفة التى تبين الـ Configuration
لمستعمرات البكتيرات النامية على بيئة آجار بالأطباق .

التعقيم Sterilization

إن معظم الدراسات الميكروبيولوجية تعتمد على المزارع النقية أى التى ينمو بها نوع واحد من الكائنات الدقيقة ، وهذه تتطلب لنموها بيئات غذائية معقمة. والتعقيم عبارة عن العمليات التى من شأنها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة فى أبعادها وأحجامها. والأشياء المعقمة يمكن الإحتفاظ بها على صورة معقمة طالما أمكن إبعادها عن التلوثات الخارجية.

وعادة يتم التعقيم بإتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية.

الطرق الفيزيائية Physical methods

تعتبر الحرارة المرتفعة وكذلك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التى تستعمل فى أغراض التعقيم، غير أن التعقيم الحرارى هو أكثر طرق التعقيم شيوعاً.

أولاً : الحـــرارة

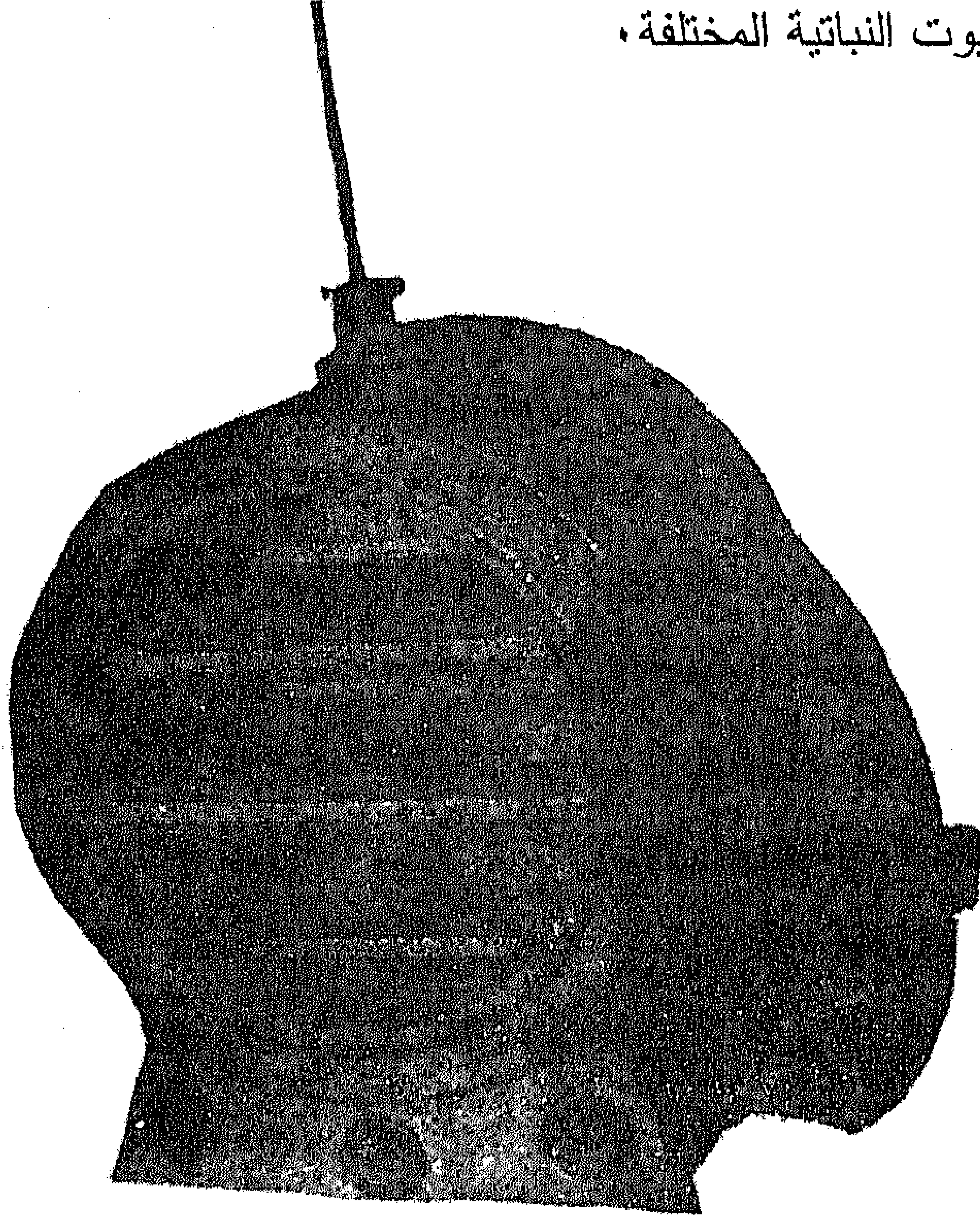
(أ) التعقيم بالحرارة الجافة: Dry heat sterilization

١- أفران الهواء الساخن: Hot air ovens

يستعمل فى هذا الغرض أفران تعرف بأفران الهواء الساخن يسخن فيها الهواء كهربياً (شكل ١٩) ، أو بإستعمال الغاز ، فترتفع درجة حرارة الهواء المحيط بالأدوات المراد تعقيمها حتى تصل إلى درجة تتراوح بين ١٦٠-١٨٠°م ويترك هكذا لمدة تتراوح بين ٢-٣ ساعات يتم بعدها التعقيم.

ويتم قتل الكائنات الحية الدقيقة التى تكون ملوثة للأدوات المعقمة بالحرارة الجافة، نتيجة للتجفيف السريع الذى يطرأ على خلاياها، وكذلك نتيجة لأكسدة المحتويات الخلوية الجافة،

وتتبع هذه الطريقة فى تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الإختبار، والماصات والدوارق الفارغة وأطباق بترى وغيرها من الأدوات الزجاجية الأخرى التى يرغب فى تعقيمها، ويجب ملاحظة أن هذه الطريقة لا تتبع فى تعقيم كل ما يخشى عليه من الجفاف مثل البيئات الغذائية والمحاليل المائية وغيرها ولكن يمكن إتباعها فى تعقيم بعض الزيوت المعدنية مثل زيت البرافين وكذلك الزيوت النباتية المختلفة،



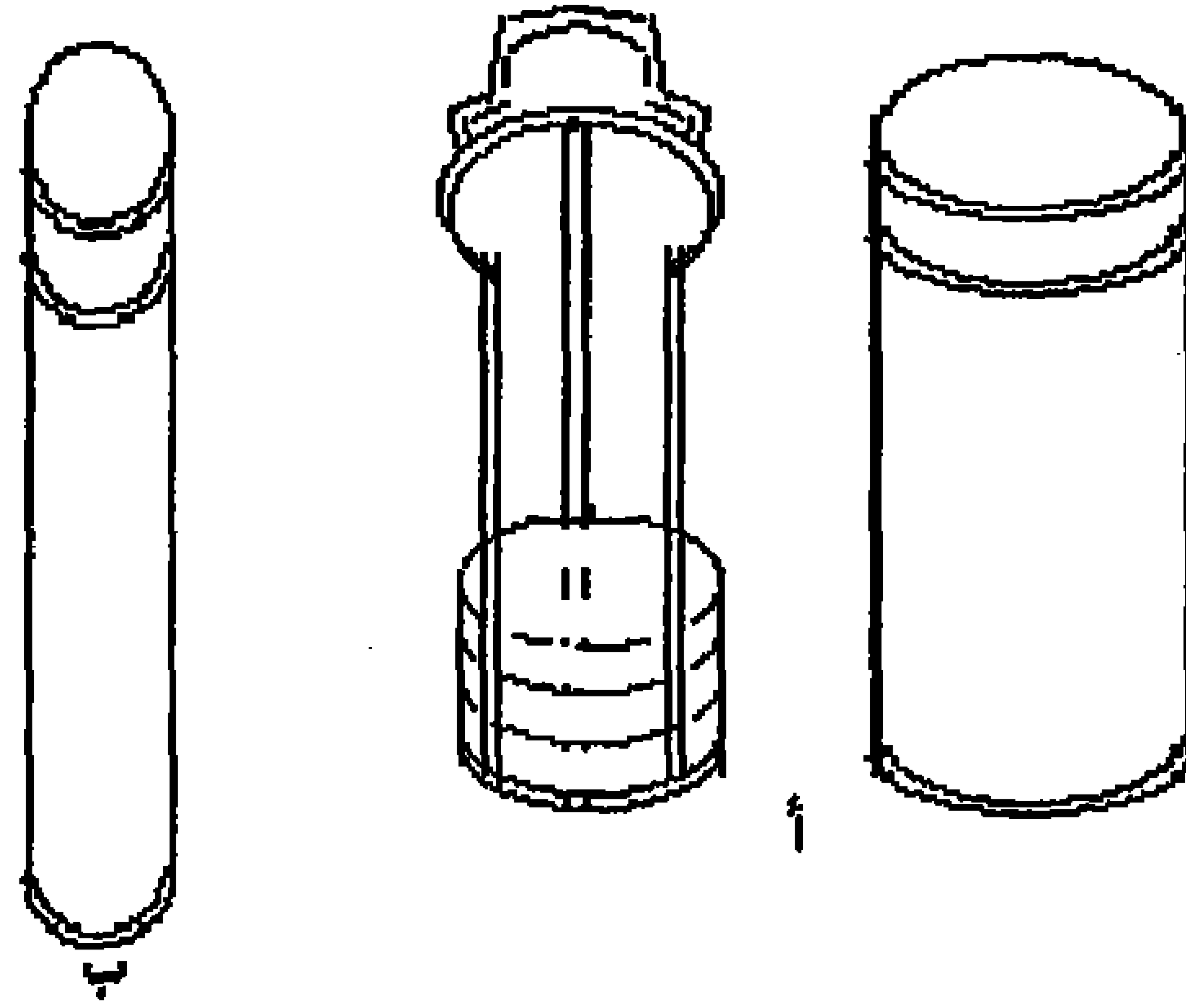
شكل ١٩: فرن الهواء الساخن (يعمل بالكهرباء) ويستعمل فى أغراض التعقيم الحرارى الجاف .

وعندما نتبع هذه الطريقة لتعقيم الأدوات الزجاجية يراعى أن توضع الماصات وأطباق بترى فى أوعية معدنية أو نحاسية خاصة ذات غطاء يحكم غلقه قبل تعقيمها (شكل٢٠)، وتتلخص خطوات التعقيم بهذه الطريقة بأن توضع الأدوات الزجاجية أو العلب المعدنية المحتوية عليها بالفرن وهو على درجة حرارة الغرفة ثم يحكم قفله، وترفع درجة حرارة الفرن إلى الدرجة المطلوبة، وهنا نبدأ فى حساب فترة التعقيم٠وبإنتهاء الفترة المطلوبة يوقف التسخين ويترك الفرن ليبرد تدريجياً حتى درجة حرارة الغرفة تجنباً لكسر الأدوات الزجاجية أو تلوثها بالهواء الجوى الذى قد يندفع إليها إذا ما أخرجت من الفرن وهى لازالت ساخنة، ويفضل تغليف الفوهات بإستعمال رقائق الألومنيوم٠

٢ـ اللهب المباشر : Incineration heat

عادة يستخدم اللهب المباشر من مصباح بنزن فى تعقيم إبر التلقيح المستقيمة أو ذات العقدة، وذلك بتسخينها حتى درجة الإحمرار٠ وعادة تصنع مثل هذه الإبر من أسلاك رفيعة من البلاتين أو خليط من النيكل والكروم٠ وهذه المعادن عادة تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة فعندما تسخن لدرجة الإحمرار يهلك كل ما يلوثها من الكائنات الحية الدقيقة، وبعد أن تترك لتبرد لفترة ثوان قليلة تستعمل فى تلقيح البيئات المعقمة للحصول على المزارع النقية٠

ويجب أن نتخذ الحيطة أثناء عملية تسخين هذه الإبر حتى لا تنتثر الأجزاء التى تكون عالقة عليها قبل أن تهلك محتوياتها من الكائنات الدقيقة٠ فقد تحمل القطرات الصغيرة المتناثرة بعض خلايا البكتيريات التى لا زالت حية٠ويمكن تلافى ذلك بتجفيف الإبر أولاً خارج منطقة اللهب وذلك بتقريبها منه لفترة بسيطة قبل وضعها فى اللهب المباشر٠



شكل ٢٠: أـ رسم تخطيطى لعلبة معدنية توضع بها أطباق بترى وأخرى للماصات تهيئة لتعقيمها فى فرن الهواء الساخن.لاحظ الحامل الداخلى الذى ترص به الأطباق .
ب ـ علبة معدنية توضع بها الماصات قبل التعقيم فى فرن الهواء الساخن .

٣ـ التلهيب الكحولى: Alcohol flaming

يمكن تعقيم بعض الأدوات كالمشرط أو الملقط أو المقص وذلك بغمر الجسم المراد تعقيمه فى كحول إيثايل ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل مايعلق به من كحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التى تكون عالقة به.

وبتكرار هذه العملية أكثرمن مرة تزداد كفاءة هذه الطريقة فى التعقيم. وتتميز هذه الطريقة بسرعتها إلا أنه يجب إستعمال الأدوات التى تعقم عن هذا الطريق مباشرة بعد تعقيمها.

(ب) التعقيم بالحرارة الرطبة : Moist heat

يقصد بالتعقيم عن طريق الحرارة الرطبة إستغلال بخار الماء فى إجراء التعقيم بدلاً من الهواء الساخن. وقد يستغل بخار الماء مباشرة أو أن يضغط إلى درجة تصل إلى ضعف الضغط الجوى العادى حيث تزداد درجة حرارة البخار تحت الضغط المرتفع.

وعادة تكـون الحـرارة الرطبـة أكثر كفـاءة فـى قتل الخلايـا الحيـة مـن الحرارة الجافة وذلك لأنها أكثر قدرة على التغلغل داخل الخلايا، كما أنهـا ذات قدرة أسرع علـى تجميـع وتخثير Coagulation البروتين الخلـوى. فـالحرارة الرطبة تفسد الطبيعة الغروية التى تميز البرتوبلازم الحى، والتـى تعتمـد عليهـا حياة الخلية. وهذا يعنى أن زيادة المحتوى المـائى للبروتين يـؤدى إلـى تخثـره على درجات حرارة أقل مما لو كان البروتين جافاً وجدول٢ يبيـن هـذه الظـاهرة فى حالة ألبيومين البيض.

جدول (٢) : تأثير المحتوى المائى لألبيومين البيض
على تجمعه أو تخثره بواسطة الحرارة المرتفعة.

النسبة المئوية للماء الموجود	درجة التجمع والتخثر Coagulation Point (°م)
٥٠	٥٦
٢٥	٧٨-٧٤
١٨	٩٠-٨٠
٦	١٤٥
صفر	١٧٠-١٦٠

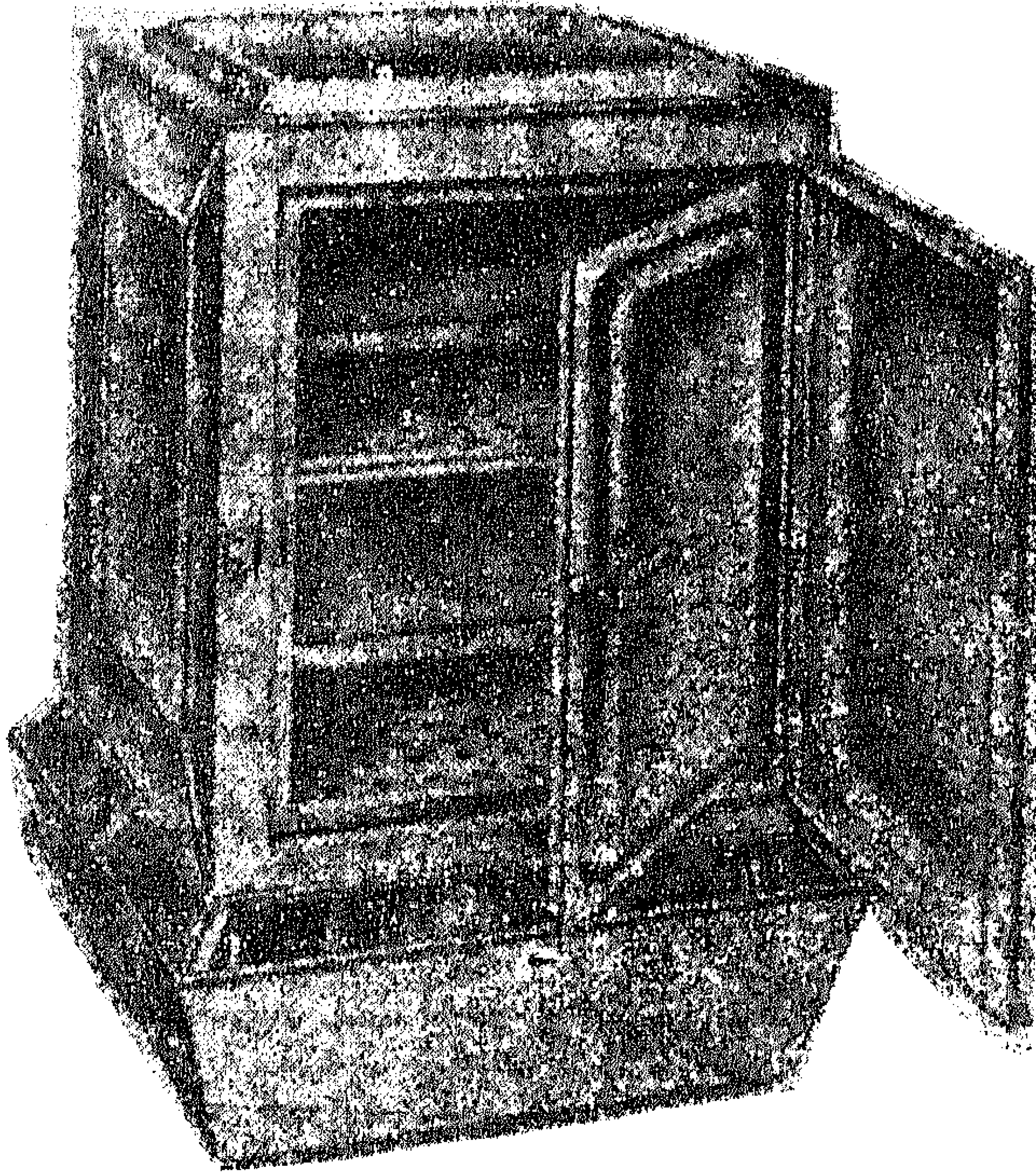
وفيما يلى وصف لطرق التعقيم بالحرارة الرطبة والأجهـزة المستعملة فيها:

١- معقم أرنولد: Arnold sterilizer

عبارة عن وعاء معدنى (شكل فرن الهواء الساخن) مبطن بطبقة عازلـة للحرارة ذو أرفف مثقوبة لتسهل تسرب البخار إلى كل أجزاء الجهاز ولـه فتحـة فى قمته يوضع بها ترمومتر لقياس درجة الحـرارة بداخـل الجهـاز أثنـاء التعقيـم

(شكل ٢١)٠ ويجب التأكد قبل تشغيل الجهاز من إحتوائه على الماء إلى الإرتفاع المناسب فى الخزان الخاص بذلك٠ وتوضع المواد المراد تعقيمها على الأرفف ويقفل الغطاء وترفع حرارة الخزان ليغلى الماء به تحت الضغط الجوى العادى، ويحسب الوقت اللازم للتعقيم عندما تصل حرارة الجهاز الداخلية إلى درجة ١٠٠°م٠

ويوجد بالأسواق معقمات بخارية أخرى أكثر تطوراً قد توصل إلى مصدر دائم للبخار بدلاً من توليد البخار فى الجهاز نفسه٠



(شكل ٢١) معقم أرنولد

ويتم التعقيم فى هذا النوع من الأجهزة على ثلاث فترات فى ثلاثة أيام متتالية، ويعرف التعقيم فى هذه الحالة بالتعقيم المتقطع Fractional sterilization أو Tyndallization • ففى اليوم الأول تعرض المواد المراد تعقيمها إلى البخار (١٠٠°م) لمدة تتراوح بين ١/٢ ـ ١ ساعة حسب طبيعة وحجم المادة المراد تعقيمها ثم تترك لتبرد، وتوضع بالحضان على درجة ٣٠°م أو تترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة• وفى اليوم الثانى والثالث تكرر العمليات السابقة، ثم تحفظ البيئات التى تعقم عن هذا الطريق فى يومها الثالث بالحضان على درجة ٣٠°م للتأكد من كفاءة التعقيم، ويمكن التعرف على ذلك بعدم ظهور نموات بكتيرية بالبيئة المعقمة •

والفكرة الأساسية فى التعقيم المتقطع هو أن الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية النابتة تهلك عندما تعرض لبخار الماء (١٠٠°م) لمدة ثلاثون دقيقة• أما الجراثيم الداخلية الناضجة وغير النابتة فإنها تقاوم هذه الحرارة حتى ولو تعرضت إليها لمدة طويلة تصل إلى عدة ساعات، كذلك فإن ترك البيئة بالحضان أو بالغرفة لمدة ٢٤ ساعة يسمح لهذه الجراثيم المقاومة للحرارة بأن تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم فى اليوم التالى•

وزيادة فى الإحتياط يعطى ما يتبقى من جراثيم فرصة أخرى للإنبات قبل إجراء فترة التعقيم الثالثة وبذلك نضمن إتمام عملية التعقيم•ويجب أن نلاحظ أنه إذا لم تنبت كل الجراثيم بالبيئة قبل إجراء التعقيم فإنه لا يمكن الإعتماد على هذه الطريقة كوسيلة للتعقيم، حيث أن حرارة البخار تحت الضغط الجوى العادى (١٠٠°م) تفشل فى قتل الجراثيم غير النابتة والمقاومة للحرارة، وقد يرجع السبب فى عدم إنبات الجراثيم أثناء إجراء التعقيم بهذه الطريقة إلى ما يأتى:

١ـ قد تكون البيئة الغذائية المراد تعقيمها غير مناسبة لإنبات الجراثيم فالماء المقطر ومحاليل بعض الأملاح المعدنية لا تعتبر وسطاً مناسباً لإنبات بعض الجراثيم.

٢ـ جراثيم البكتيرات غير الهوائية لن تنبت طالما كانت البيئة معرضة إلى ظروف هوائية.

وتتبع طريقة التعقيم المتقطع هذه عادة فى تعقيم البيئات التى يدخل فيها الجيلاتين واللبن والسكريات التى يخشى من تحللها إذا ما أستعملت طريقة التعقيم بالبخار تحت ضغط مرتفع حيث تزيد درجة الحرارة فى الحالة الأخيرة عن ١٠٠°م.

٢ـ الأوتوكلاف: Autoclave

يستغل بخار الماء أيضاً فى جهاز الأوتوكلاف إلا أن زيادة الضغط بداخل الجهاز تزيد من درجة حرارة التعقيم. فمن المعروف أن الماء يغلى على درجة حرارة ١٠٠°م تحت الضغط الجوى العادى أما إذا زاد الضغط فوق الماء عن الضغط الجوى فإنه يغلى على درجات أكثر إرتفاعاً . وجدول ٣ يبين العلاقة بين ضغط البخار ودرجة الحرارة التى يصل إليها.

وجهاز الأوتوكلاف (شكل ٢٢) فى أبسط صورة عبارة عن أسطوانة معدنية عادة تصنع من الصلب أو من سبائك معدنية قوية تتحمل ضغط قد يصل إلى ٣٠ رطل/ بوصة مربعة على الأقل ، له غطاء يقفل بإحكام بعد أن يوضع به المواد المراد تعقيمها، وبعد التأكد من إحتواء الجهاز على الماء إلى الإرتفاع المناسب مع ترك صنبور البخار(أ) مفتوحاً تشعل مصابيح بنزن (إذا كان الجهاز يعمل بالغاز)أو يوصل التيار الكهربائى (إذا كان تسخينه يتم بالكهرباء)، أو يدفع به بخار الماء (من مصدر دائم للبخار) ، وعندما يشاهد البخار خارجاً بشدة من

الصنبور (أ) فإن هذا يعنى خلو الجهاز من الهواء وإمتلائه بالبخار • عندئذ يقفل الصنبور (أ) جيداً ويترك البخار ينضغط بداخل الجهاز حتى يصل إلى الضغط المطلوب وهو ١٥ رطل /بوصة مربعة ويعرف ذلك بالإستعانة بالمانومتر المتصل بالجهاز • ويمكن تنظيم الضغط بداخل الجهاز بتعديل طول ذراع رافعة تتحكم فى قفل وفتح صمام الأمن• وهناك طرقاً أخرى لتنظيم الضغط فى الأجهزة الأكثر تطوراً• وتحت هذا الضغط (١٥ رطل /بوصة مربعة) تصل درجة حرارة البخار إلى ٦, ١٢١ْم وعندما يصل الضغط والحرارة إلى هذه الدرجة يحسب وقت التعقيم الذى يختلف بإختلاف طبيعة وحجم المواد المراد تعقيمها والجدول ٤ يبين الوقت اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من محاليل مائية أو سوائل معبأة فى أوعية مختلفة الحجم•

جدول (٣) العلاقة بين زيادة ضغط البخار ودرجة حرارته

ضغط البخار رطل/بوصة مربعة	درجة الحرارة ْم
صفر	١٠٠
٥	١٠٧ ,٧
١٠	١١٥ ,٥
١٥	١٢١ ,٦
٢٠	١٢٦ ,٦
٢٥	١٣٠ ,٥
٣٠	١٣٤ ,٤

بعد إنتهاء مدة التعقيم يوقف مصدر الحرارة فينخفض تدريجياً كل من درجة الحرارة والضغط بداخل الجهاز.

ويراعى عدم الإسراع فى خفض الضغط بداخل الجهاز فجأة وذلك بفتح الصنبور (أ) حيث أن السوائل تكون عندئذ على درجة أعلى من ١٠٠°م وأن تعرضها فجأة لضغط الجو العادى يؤدى إلى غليانها بشدة داخل الأوعية وإلى تطاير سداداتها بعيداً عنها، لذلك يجب أن نسمح بالإنخفاض التدريجي للضغط بداخل الجهاز حتى يصبح مساوياً للضغط الجوى ويمكن التأكد من ذلك بالإستعانة بالمانومتر. وبعدها يفتح الصنبور (أ) ثم يفتح غطاء الجهاز وترفع الأدوات المعقمة.

جدول (٤) : الوقت اللازم لتعريض محاليل مائية أو سوائل بداخل أوعية مختلفة الحجم ليتم تعقيمها فى جهاز الأوتوكلاف.

الوعاء	سعة الوعاء	وقت التعريض بالدقائق عند ١٢١ـ١٢٣°م
أنابيب إختبار	١٨×١٥٠مم	١٢ـ١٤
أنابيب إختبار	٣٢×٢٠٠مم	١٣ـ١٧
أنابيب إختبار	٣٨×٢٠٠مم	١٥ـ٢٠
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠مل	١٢ـ١٤
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠مل	١٢ـ١٥
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠٠مل	١٧ـ٢٢
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠٠مل	٣٠ـ٣٥

وقد تقل كفاءة التعقيم بالأوتوكلاف إذا ما أهمل إخراج الهواء من داخل الجهاز قبل قفل الصنبور (أ) حيث أن وجود الهواء مختلطاً بالبخار بداخل الجهاز يقلل من درجة حرارة التعقيم فقد وجد أن درجة حرارة مخلوط من البخار والهواء عند ضغط معين تكون أقل بكثير من درجة حرارة البخار بمفرده عند نفس الضغط (جدول ٥)٠

ولما كانت فاعلية الأوتوكلاف فى التعقيم ترجع إلى الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط وليس إلى الضغط المرتفع بمفرده ، لذا فإننا نلمس أهمية إرتفاع الحرارة بداخل هذا الجهاز وأن أى عامل يقلل من الحرارة يعتبر مقللاً لكفاءة التعقيم٠

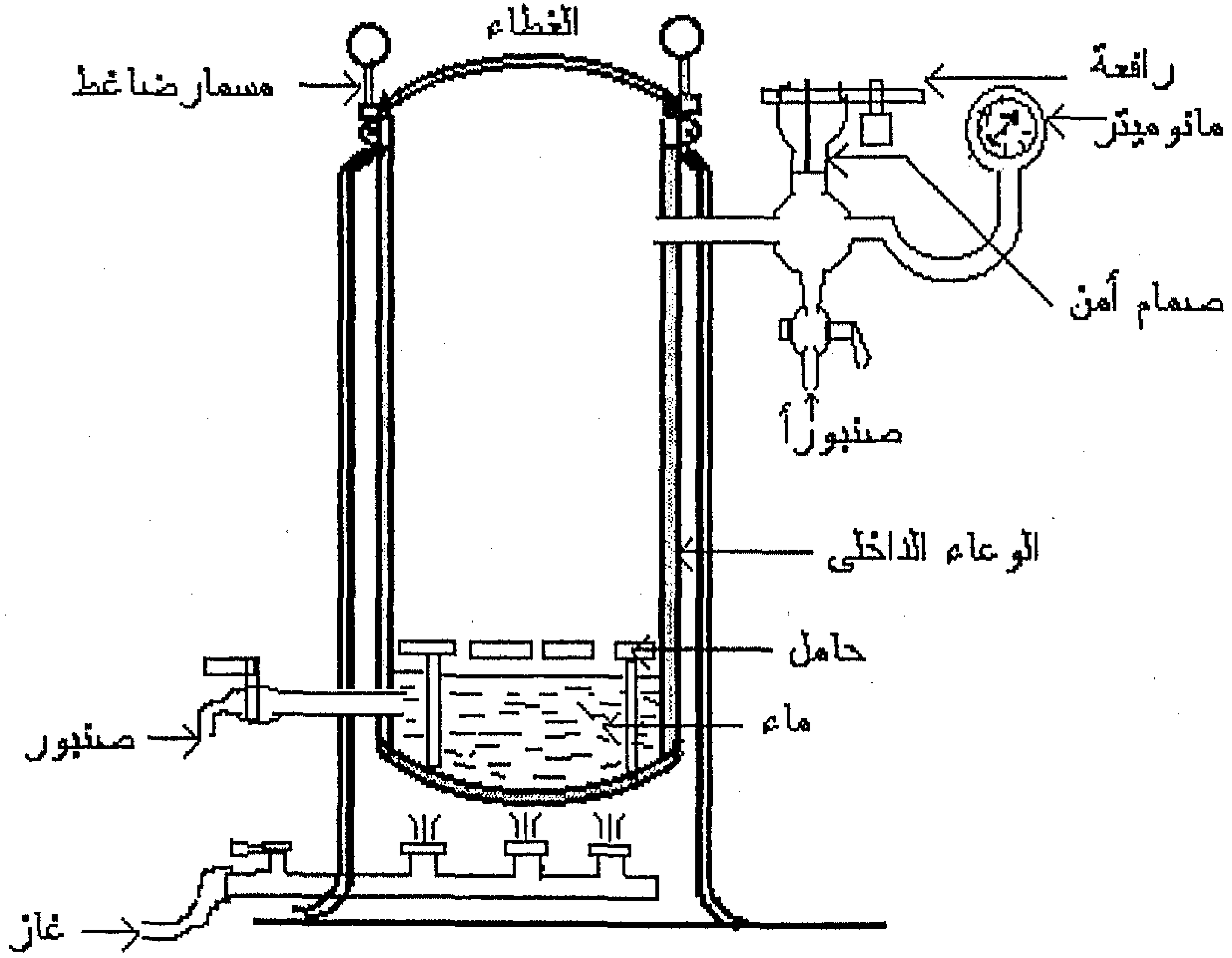
كذلك يجب أن نراعى أهمية وصول البخار إلى المادة المراد تعقيمها فإذا لم يصل البخار إلى المادة فإن عملية التعقيم لا تخرج عن كونها عملية تعقيم حرارى جاف (١٢١°م لمدة عشرون دقيقة) الأمر الذى لا يكفى للتعقيم حتى بالحرارة الجافة كما سبق أن بينا، ويحدث ذلك عادة إذا قفلت الأوعية بسدادات شديدة الإحكام أو قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكمّيات الكبيرة من التربة فإن ذلك يعوق وصول البخار إلى داخلها ويشترط عدم إحكام غلق السدادات وأن تغطى الأوعية بسدادات مسامية من القطن أثناء تعقيمها٠

ويستعمل الأوتوكلاف عادة فى تعقيم كثير من البيئات الغذائية السائلة أو المضاف إليها الآجار آجار ومحاليل السكريات الأحادية ومحاليل الأملاح المختلفة ، وكذلك يستعمل الأوتوكلاف فى قتل المزارع القديمة قبل التخلص منها ٠ وكذلك فى تعقيم الملابس والقفازات وأدوات الجراحة ٠

وهناك بعض المواد لا يمكن تعقيمها بالأوتوكلاف مثل المواد التى لا تمتزج بالماء مثل الدهون والزيوت وكذلك المواد التى تتأثر بالحرارة المرتفعة٠

وفى بعض الأحيان يمكن إستعمال الأوتوكلاف كمعقم حراري تحت الضغط الجوى العادى، وذلك إذا أستعمل مع ترك الصمام (أ) مفتوحاً٠

وتختلف سعة الأوتوكلافات تبعاً للحاجة إليها فهناك أوتوكلافات كبيرة الحجم تستعمل فى مصانع حفظ الأغذية حيث يشترط تعقيم المعلبات تعقيماً تاماً، وتستعمل آلات رفع كبيرة فى وضع وإخراج الكميات الكبيرة من المعلبات قبل وبعد تعقيمها بداخل الأوتوكلاف فى هذه المصانع٠



شكل ٢٢ : قطاع طولى فى الأوتوكلاف٠

جدول (٥): العلاقة بين درجة تفريغ الهواء ودرجة الحرارة
داخل الأوتوكلاف عند ضغط بخار ١٥ رطل/بوصة مربعة ٠

تفريغ الهواء	ضغط البخار رطل/بوصة مربعة	درجة الحرارة داخل الأوتوكلاف °م
تام	١٥	١٢١
٣/٢	١٥	١١٥
٢/١	١٥	١١٢
٣/١	١٥	١٠٩
صفر	١٥	١٠٠

إختبار كفاءة التعقيم فى الأوتوكلاف:

تختبر الكفاءة التعقيمية للأوتوكلاف بالتأكد من أن درجة الحرارة المبينة على الترمومتر وقيمة الضغط التى يبينها المانوميتر هى قيماً حقيقية للحرارة والضغط بداخل الجهاز، إذ أحياناً ما تختلف القراءات التى تظهرها هذه المقاييس عن الواقع بداخل الأوتوكلاف لعطل قد يصيبها وفى هذه الحالة لا يكون التعقيم سليماً ، ولمنع مثل هذه الأخطاء يلحق بالأوتوكلافات الكبيرة الحجم وخاصة تلك المستعملة فى مصانع الحفظ والمستشفيات ثيرموجراف يتصل ذراعه بالترمومترات الداخلية للتأكد من انتظام الحرارة ولتسجيل ما قد يطرأ على درجة الحرارة من إختلاف أثناء فترة التعقيم٠وأختبار كفاءة التعقيم تتم إما بطريقة حيويه أو طريقة كيماوية٠

التمرين الخامس عشر (أ)

أختبار كفاءة التعقيم بطريقة حيويه٠

١ـ ضع كمية من القطن أو قصاصات من ورق الترشيح بعد تشبيعها بمعلق من جراثيم البكتيرة وهما من البكتيرات المحبة للحرارة Thermophilic

والتـــى تتحمـــل جراثيمهـــا درجـــات حـــرارة مرتفعـــة مثـــل *Bacillus stearothermophilus* أو *Bacillus subtilis* إن لـم تتوفـر البكتـيرة الأولـى فـى أظرف من الورق ٠

٢ـ ضع الأظرف فى مكان مناسب بالأوتوكلاف أثناء التعقيم ٠

٣ـ بعد إنتهاء عملية التعقيم، يؤخذ جزء من القطن أو إحـدى قصاصـات ورق الترشيح ويغمر فى بيئة زرع معقمة ومناسبة ٠

٤ـ يحضن المزارع على درجة ٥٥°م فى حالة البكتيرة الأولـى ، ٣٧°م فى حالة البكتيرة الثانية لمدة ٢٤ ساعة ٠

٥ـ ظهور نمو واضح بالبيئة بعد فترة التحضين يـدل علـى عـدم كفـاءة التعقيم، (من المعروف أن درجة الحـرارة المهلكـة لجراثيـم هـذه البكتـيرات هـى ١٢١°م عندما تعرض لها لمدة ١٢ دقيقة) ٠

التمرين الخامس عشر (ب)

أختبار كفاءة التعقيم بطريقة كيماوية

١ـ ضع كميـة صغيرة مـن أحـد المـواد الكيماويـة ذات درجـة إنصـهـار تشابه درجة حـرارة التعقيـم فـى الأوتوكـلاف (مثـل الكبريت ودرجـة إنصـهـاره ١١٥°م أو Succinic anhydride ودرجة إنصهاره ١٢٠°م) فى أنابيب شعرية فـى الأوتوكلاف أثناء إجراء التعقيم٠

٢ـ إذا إنصهرت هذه المواد دل ذلك على كفاءة التعقيم ووصـول درجـة الحرارة فى الأوتوكلاف أثناء التعقيم إلى درجة لا تقل عن درجة إنصهار المـادة المستعملة٠

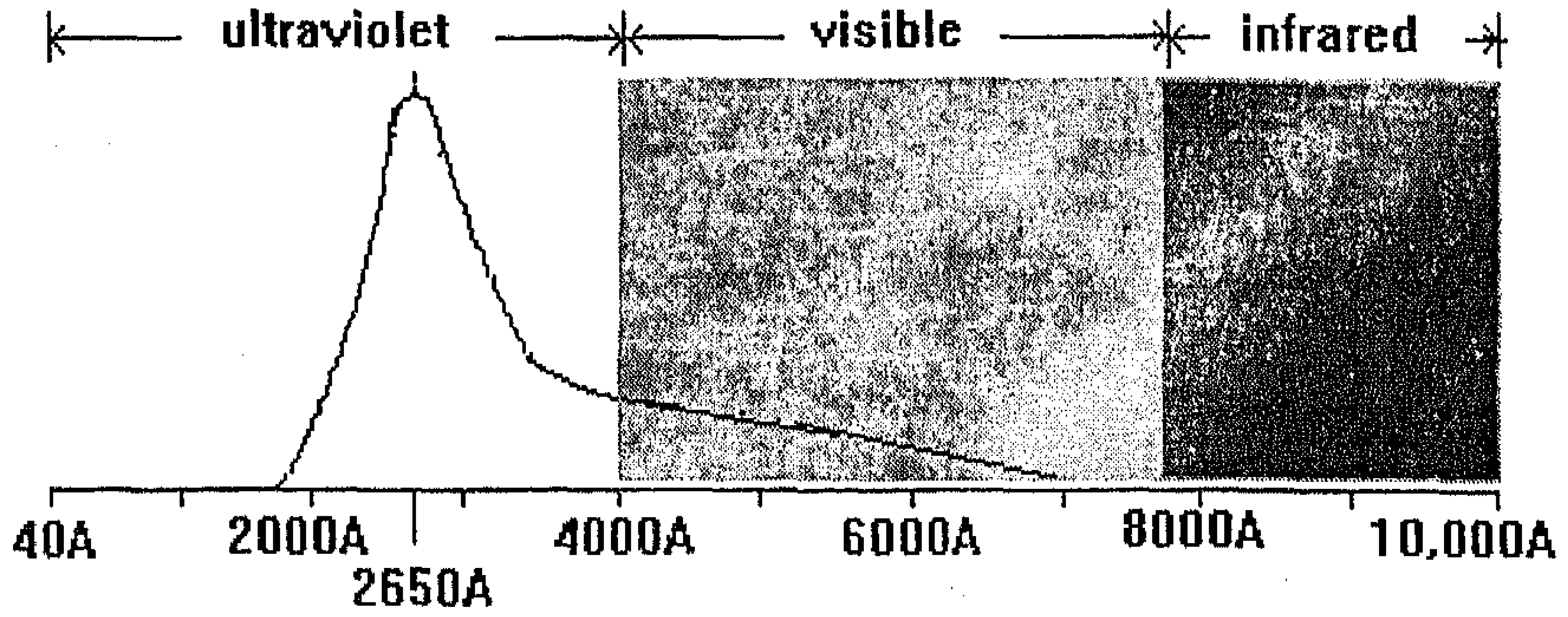
ومن عيوب هذه الطريقة أنها لا تبين مدى إستمرار الحـرارة المرتفعة داخل الأوتوكلاف فقد تهبط درجة حرارة الأوتوكلاف عقب إنصهار المادة٠

ثانياً : الإشعاعات Radiations

يستفاد عملياً من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على خلايا البكتيرات فى تعقيم الأماكن كغرف العمليات الجراحية وعنابر تعبئة الأدوية والعقاقير المعقمة أو فى غرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتيريولوجية الكبيرة ، وفى بعض الصناعات الغذائية أو صناعات الألبان أو فى تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة فى محطات الحجر الزراعى لتطهير المنتجات الزراعية مما يكون عالقاً بها من كائنات ممرضة يخشى إنتقالها من مكان إلى آخر، كما يمكن تعقيم أطباق بترى أو الماصات المصنوعة من البلاستيك بواسطة الأشعة فوق البنفسجية بعد تغليفها فى أكياس من مادة البولى اثيلين وذلك خوفاً من استعمال الحرارة فى تعقيمها٠والشكل (٢٣) يبين المناطق الفعالة فى المجال الضوئى فى إبادة الكائنات الدقيقة ٠

١ـ الآشعة فوق البنفسجية: Ultraviolet radiation

عادة تستعمل هذه الآشعة أكثر من غيرها فى أغراض التعقيم وفى الأغراض السابق ذكرها ويمكن الحصول عليها من صمامات خاصة يمكنها أن تشع تركيزات مرتفعة من هذه الآشعة والتى يتراوح طول موجاتها من ٢٦٠إلى ٢٧٠ nm وهو النطاق الفعال فى إبادة الأحياء الدقيقة٠ ويلاحظ أن للآشعة فوق البنفسجية قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء، من ذلك نرى أن فعلها التعقيمى يكون غالباً سطحياً، كما أن طبقة رقيقة من الزجاج قد تحجز نسبة كبيرة منها لذلك يتجنب تعقيم المواد فى الأوعية الزجاجية، وقد يعزى التأثير المميت للآشعة فوق البنفسجية إلى تكوين فوق أكاسيد Peroxides فى الوسط المعامل وهذه تعمل كعامل مؤكسد ، أو نتيجة لتأثيرها على DNA الخلية٠



شكل ٢٣: يبين المناطق الفعالة فى المجال الضوئى فى إبادة الكائنات الحية الدقيقة .

٢ـ الإشعاعات الأخرى:

يمكن إستعمال الآشعة السينية X-rays ذات الموجات القصيرة التى تعرف أيضاً باسم Roentengen rays، وكذلك آشعة جاما ذات الموجات التى يتراوح طولها بين ٠٠٠٥, و ١ nm فى أغراض التعقيم وهذه الإشعاعات لها قدرة عالية على إختراق الأجسام الصلبة والتغلغل فيها، ولازال استعمال الآشعة السينية فى هذا الصدد من الأمور غير العملية وذلك لتطلبها أجهزة خاصة ولزيادة تكاليفها.

ونظراً لما لآشعة جاما من القدرة العالية على الإختراق فيقتصر استعمالها فى التعقيم الداخلى للأجسام الصلبة السميكة فقط.

الطرق الكيميائية المتبعة فى التعقيم

يمكن استعمال بعض المواد الكيماوية فى أغراض التعقيم وذلك لفعلها المميت أو الموقف لنمو خلايا الأحياء الدقيقة، وفيما يلى بعض المواد الكيماوية التى تستعمل وهى فى صورة محاليل للتعقيم السطحى للمواد التى لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية،

كحول الإيثيل Ethyl alcohol

يستعمل عادة كحول الإيثيل بتركيز يتراوح بين ٥٠ـ٧٠٪فى تطهير الأيدى أو المناطق المختلفة فى جسم الإنسان ، والسبب الأساسى للتأثير السام للكحول هو أنه يعمل على تجفيف الخلايا Dehydration حيث يسحب الماء منها، علاوة على قدرته على تجميع وتخثير Coagulation البروتين الخلوى عندما ينفذ إلى داخل الخلايا، وكلا التأثيرين يؤديان إلى موت الخلية Bactericidal action، ويقال أن قلة الكفاءة التعقيمية للتركيزات الكحولية التى تزيد عن ٧٠٪ وكذلك الكحول المطلق ١٠٠٪ ، قد ترجع إلى زيادة فعلها التجفيفى على حساب القدرة التخثرية للكحول بمعنى أن كمية الماء المزالة من الخلايا تكون كبيرة بدرجة تعوق دخول الكحول إلى الخلايا، لذلك يكون تأثير التركيزات المرتفعة من الكحول تأثيراً مجففاً فقط وهذا يتسبب عنه إيقاف لنمو الخلايا Bacteriostatic action،

ومما هو جدير بالذكر أنه ليس للكحول بجميع تركيزاته أى تأثير ضار على الجراثيم الداخلية،

الفينول أو حمض الكربوليك Phenol or Carbolic acid

يستعمل محلول هذه المادة بتركيزات تتراوح بين ٢ـ٥٪ للتعقيم السطحى لأرضيات الغرف والعيادات والمعامل وكذلك فى تعقيم أسطح المناضد التى تجرى عليها عمليات العزل والتنمية لمزارع الكائنات الدقيقة وبعض

الأدوات والأجهزة• وتقتل التركيزات المستعملة (٢-٥٪) من الفينول خلايا الكائنات الحية الدقيقة نتيجة لتجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوى بمعنى أنها ذات تأثير مميت•

كلوريد الزئبقيك ($HgCl_2$) Mercuric chloride

يستعمل محلول كلوريد الزئبقيك والذى يطلق عليه أيضاً السليمانى بتركيز ١,٪ فى أغراض التعقيم السطحى لكثير من الأشياء مثل تعقيم أسطح المناضد وغيرها كما يستعمل هذا المحلول فى التعقيم السطحى للأجزاء النباتية المصابة بأمراض نباتية توطئة لعزل الطفيل المسبب من أنسجة النبات الداخلية فى حالة نقية• ويرجع الفعل السام لهذا المحلول إلى إرتباط أيونات الزئبق بمجاميع السلفاهيدريل Sulfhydryl group (-SH) فى البروتين الإنزيمى فيتوقف نتيجة لذلك نشاط هذه الإنزيمات حيث أن نشاط كثير من الإنزيمات يعتمد على وجود هذه المجاميع بصورة حرة• أما إذا زاد تركيز كلوريد الزئبقيك فإن ذلك يؤدى إلى تجميع وتخثير البروتين الخلوى علاوة على إرتباطه بالمجاميع الفعالة السالفة الذكر•

أكسيد الإيثيلين Ethylene oxide

بعض المواد التى تستعمل فى تحضير بيئات الزرع تكون حساسة للتعقيم بالطرق الحرارية• فمثل هذه المواد يمكن أن تعقم بطريقة كيماوية• والمادة التى تستعمل فى التعقيم الكيميائى يجب أن تكون متطايرةVolatile وكذلك سامة للكائنات الحية الدقيقة• وبذلك يمكن إزالتها من المادة المراد تعقيمها بعد المعاملة وأهم مادة استعملت هى أكسيدالإيثيلين وهى مادة سائلة تغلى على درجة ١٠,٧ °م يمكن أن تضاف إلى المحاليل فى صورة سائلة (التركيز النهائى يصل إلى ٥,-١٪) على درجة حرارة من صفر-٤°م• أو تستعمل فى صورة غازية على حرارة أعلى من درجة غليانها•وهى غير ثابتة كيماوياً فتتحلل فى المحاليل

المائية إلى جليكول الإيثيلين Ethylene glycol وهو غير متطاير وقد يكون له تأثيرات غير مرغوبة ويلاحظ أن أكسيد الإثيلين قابل للإنفجار وسام للإنسان ولذلك يجب أن تتبع إحتياطات خاصة فى إستعماله • ولهذه الأسباب لا يستعمل كوسيلة روتينية فى المعامل ولكن يستعمل فى الصناعة فى تعقيم أطباق بترى المصنوعة من البلاستيك أو أى مواد أخرى من البلاستيك كالسرنجاتوالتى قد تنصهر على درجات حرارة أعلى من ١٠٠°م•

الطرق الميكانيكية المتبعة فى التعقيم

تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كالترشيح حيث تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التى تزيد عن أقطار ثقوبها•

الترشيح Filtration

يستعمل لذلك مرشحات بكتيرية يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون واحد إلى عدة ميكرونات• ويراعى أن التعقيم بالترشيح لا يتوقف فقط على قطر الثقوب، بل يتوقف أيضاً على الشحن الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الدقيقة المحتوى عليها السائل، وكذلك على طبيعة ذلك السائل المراد ترشيحه• وعادة يسحب السائل خلال المرشح بإحداث ضغط سالب (تفريغ) على الجانب الآخر من المرشح حيث تستخدم مضخة تفريغ مائية أو كهربائية• وقد يستعمل فى بعض الحالات ضغط موجب وذلك بالضغط فوق سطح السائل نفسه لدفعه خلال ثقوب المرشح وهناك عديد من المرشحات تختلف فى نوع المادة التى ...نع منها المرشح وهى كما يلى:

١- **مرشح شمبرلاند: Chamberland filter** وهو مصنوع من نوع معين من الخزف أو الصينى•

٢ـ مرشح بيركفيلد: Berkefeld filter وهو مصنوع من الطين الدياتومى Diatomaceous earth،

٣ـ مرشح عجينة باريس: Plaster of paris filter وهو مصنوع من عجينة باريس وهو من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع كربونات كالسيوم وأكسيد ماغنيسيوم،

٤ـ مرشح زايتس : Seitz filter والمرشح عبارة عن أقراص مختلفة الحجم من مادة الأسبستس،

٥ـ مرشح الزجاج المسامى: Sintered glass filter والمرشح مصنوع من الزجاج المسامى،

٦ـ المرشحات الغشائية أو الجزيئية: Membrane filter or molecular filter ومن أمثلتها ما يعرف Millipore filters والذى يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من أسترات السليلوز،

وعادة تستعمل طريقة الترشيح فى تعقيم محاليل كثير من المواد الكيماوية التى لايمكن تعقيمها عن طريق الحرارة الرطبة بنوعيها ، حيث أن الحرارة المرتفعة تغير من الخواص الكيميائية والفيزيائية لهذه المواد ومن أمثلة ذلك التحضيرات الإنزيمية أو محاليل المضادات الحيوية أو السموم التى تفرز فى المزارع أثناء نمو بعض البكتيرات لذلك فإن مثل هذه المواد تعقم بالترشيح بدلاً من الحرارة المرتفعة ،

ولما كانت حبيبات الفيروس يمكنها أن تمر خلال ثقوب هذه المرشحات لذلك فهى تستخدم فى عزل الفيروسات أو البكتيريوفاجات عن الخلايا البكتيرية أو عن بقايا تحللها،

والمرشحات الخزفية أو الدياتومية أو الزجاجية أو المصنوعة من أقراص الأسبستس، أو التى تتكون من سليكات معدنية، تحمل شحنات كهربائية

سالبة • فمثلاً عندما ترشح حبيبات تحمل شحنات موجبة خلال هذه المرشحات فإنها تجذب إلى أيونات السليكا ذات الشحنة المضادة وتبقى مثبتة ومدمصة على المرشح، وهذا ما يحدث كثيراً عند ترشيح الفيروسات والبكتيريوفاجات خلال مرشح زايتس ذو الأقراص الأسبستية أيضاً • ولكن يلاحظ أنه إذا زاد تركيز الحبيبات أو جزيئات الفيروس فى المحلول بدرجة تفوق ما يلزم منها للتفاعل مع أيونات السليكات أو الأسبستس فإنه يمكن للكمية الزائدة أن تمر خلال ثقوب المرشح • كما يلاحظ أيضاً أن التجاذب أو الإدمصاص بين جزيئات المادة المرشحة وأيونات السليكا يكون تجاذباً مؤقتاً يمكن الرجوع فيه حيث أن إمرار الماء خلال مثل هذا المرشح يؤدى إلى إنفصال الجزيئات المدمصة ومرورها خلال الثقوب • أما المرشحات المصنعة من عجينة باريس فإنها على العكس تحمل شحنات موجبة فهى بذلك لا تعوق ترشيح الجزيئات ذات الشحنات الموجبة • ومن ذلك يتضح أنه يمكننا أن ننتقى المرشح المناسب حسب طبيعة الشحنات التى تحملها جزيئات المادة المراد ترشيحها، وسوف نتناول فيما يلى وصفاً مختصراً لبعض المرشحات الشائعة الإستعمال •

١- مرشح زايتس Seitz filter

يعتمد هذا المرشح على أقراص من خليط من الأسبستس * والسليلوز ذات أقطار مختلفة وسمك يتراوح بين ٢-٣ مم يوضع بين شطرى الجهاز (شكل

---

* وأقراص الأسبستس يمكن الحصول عليها من عدد من الشركات والبعض منها ينتج للإستعمال تحت ظروف معينة فمثلاً الأقراص التى تنتجها شركة - Ford's Sterimatus لها درجات مختلفة يميزها الرموز التالية: , GS= General sterilizing

GS/pH= Liquids sensitive to alkalinity

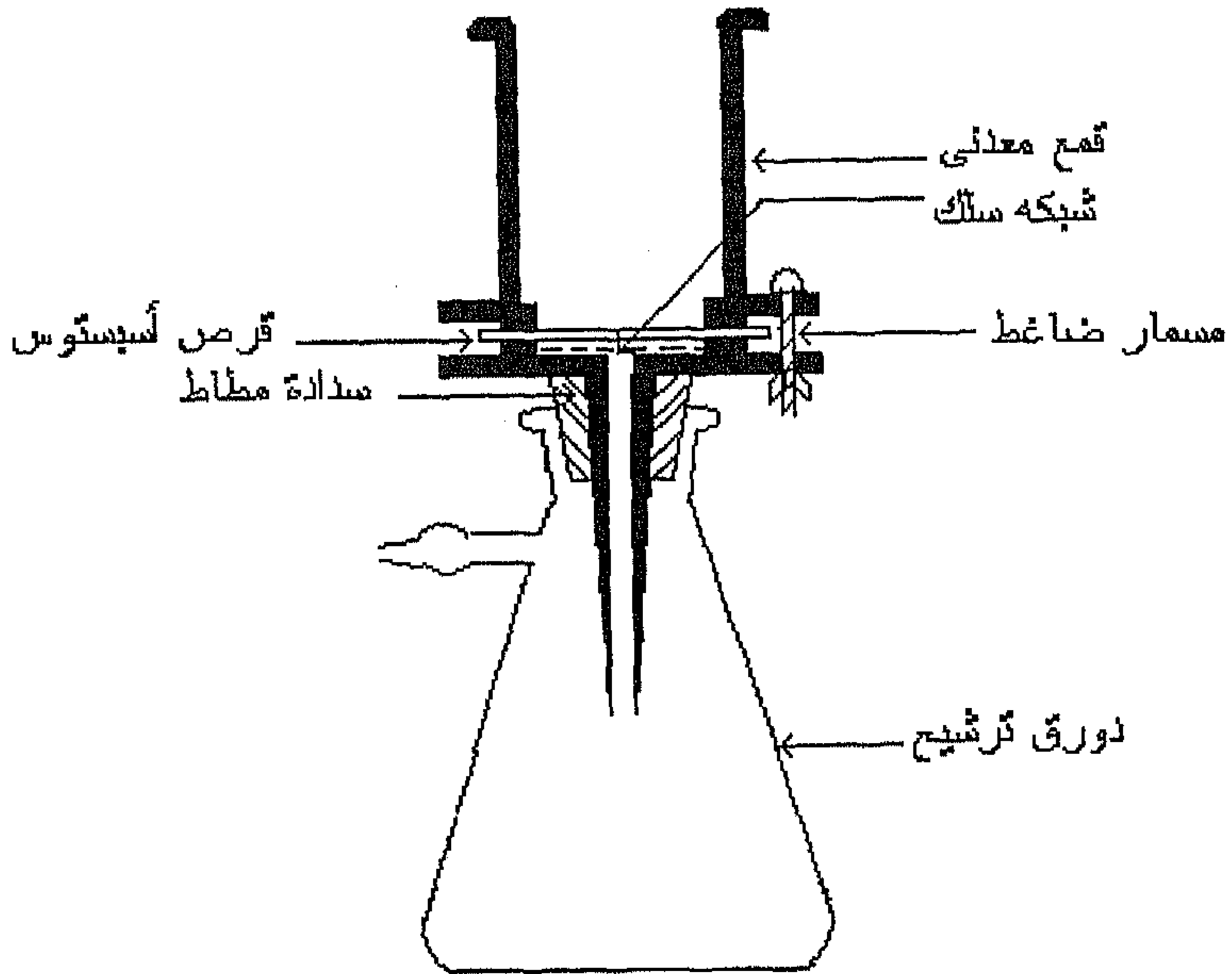
SB= Sterilizing liquids containing smallest micro-organisms

أما تلك التى تنتجها شركة John Carson فهى من نوع واحد وتستعمل تحت مختلف الظروف • EKS-for general sterile filtration

٢٤ أ) والذى يشبه القمع إلى حد ما وتثبت بواسطة مسامير بريمية ضاغطة، وقمة الجهاز عبارة عن قمع صغير يوضع به المحلول المراد ترشيحه. وعادة يثبت الجهاز فى قمة دورق مخروطى خاص بالتفريغ يوصل إلى مضخة التفريغ ليساعد عملية الترشيح، ويراعى ضرورة تعقيم الجهاز قبل إستعماله وذلك بوضعه كاملاً فى الأوتوكلاف بعد تغليفه بالورق وتغطية الفتحة الجانبيةللدورق بسدادة من القطن لتمنع تكثيف البخار بداخله وكذلك لتمنع التلوث بعد التعقيم.

ويراعى أن يترك الجهاز بعد تعقيمه ليبرد ثم يستعمل الترشيح ويجمع المحلول المعقم (الراشح) فى الدورق المخروطى ويمكن بعد ذلك نقله بواسطة ماصة معقمة إلى أوعية أخرى معقمة.

ويلاحظ ضرورة إستعمال قرص جديد من الأسبستس عند كل عملية ترشيح مع مراعاة تعقيم الجهاز فى كل مرة.



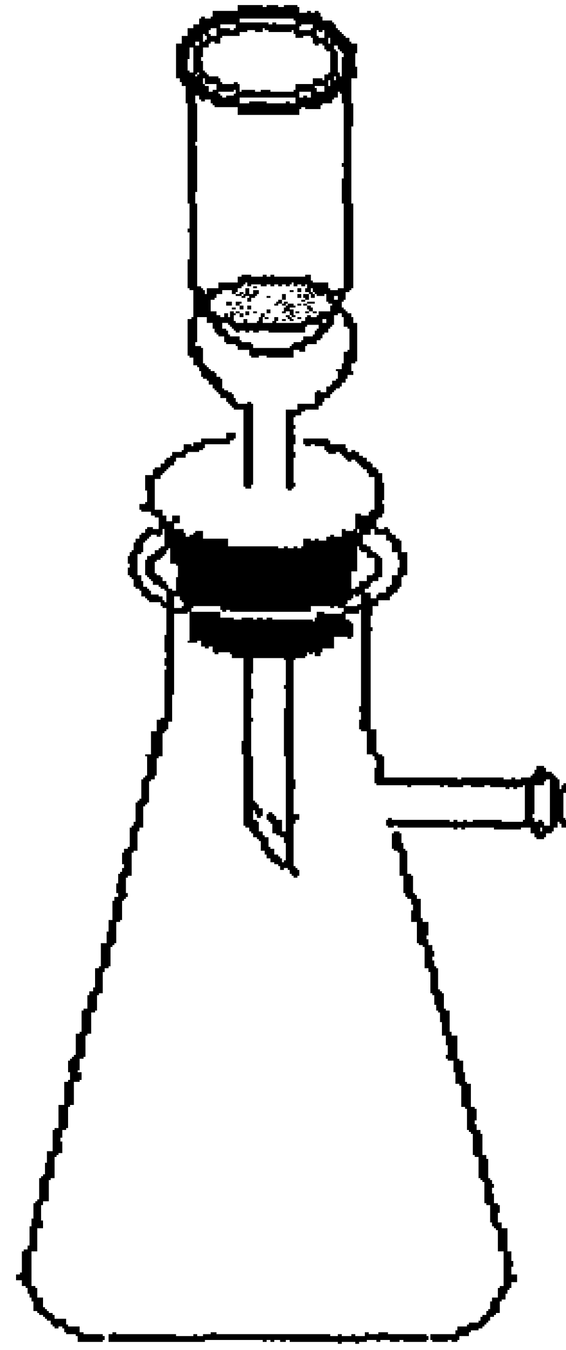
شكل ٢٤ أ : قطاع طولى فى مرشح زايتس.

٢- مرشحات الزجاج ذات المسام الدقيقة

Sintered glass filters or Fritted glass filters

تعتمد هذه المرشحات على طبقة من الزجاج المسامى يثبت فى أقماع زجاجية والطبقة المسامية المستخدمة تجهز من مسحوق ناعم من زجاج معين يسخن إلى درجة عالية من الحرارة لاتسمح بإنصهار الزجاج ولكن تسمح بتماسك المسحوق وتحوله إلى طبقة متصلة، بمعنى أن تتحد حبيبات المسحوق دون أن ينصهر الزجاج وبذلك تترك الحبيبات بينها مساماً دقيقة يمكن إستعمالها فى الترشيح. (شكل ٢٤ ب) ويراعى عند الاستعمال أن يثبت القمع عن طريق سدادة مطاط فوق دورق ترشيح مخروطى من زجاج سميك له فتحة جانبية لتوصلها إلى مضخة التفريغ.

وهناك خمس درجات من هذه المرشحات تبعاً لقطر ثقوبها ويشار لكل منها برقم خاص لتمييزه عن الأنواع الأخرى والنوع رقم ٥ (Grade 5) ذو مسام أضيق قطراً من الأنواع الأخرى لذلك فهى تستعمل كثيراً فى الأغراض البكتيريولوجية.



شكل ٢٤ ب : مرشح الزجاج المسامى.

وعادة تنظف هذه المرشحات بمعاملتها بحمض الكبريتيك المركز المضاف إليه نترات الصوديوم حيث أن هذا الحامض القوى يؤكسدويذيب المواد

العضوية التى تكون عالقة على سطح أو داخل مسام المرشح والتى يمكن بعدئذ التخلص منها ومن آثار الحمض بالغسيل بالماء الجارى٠

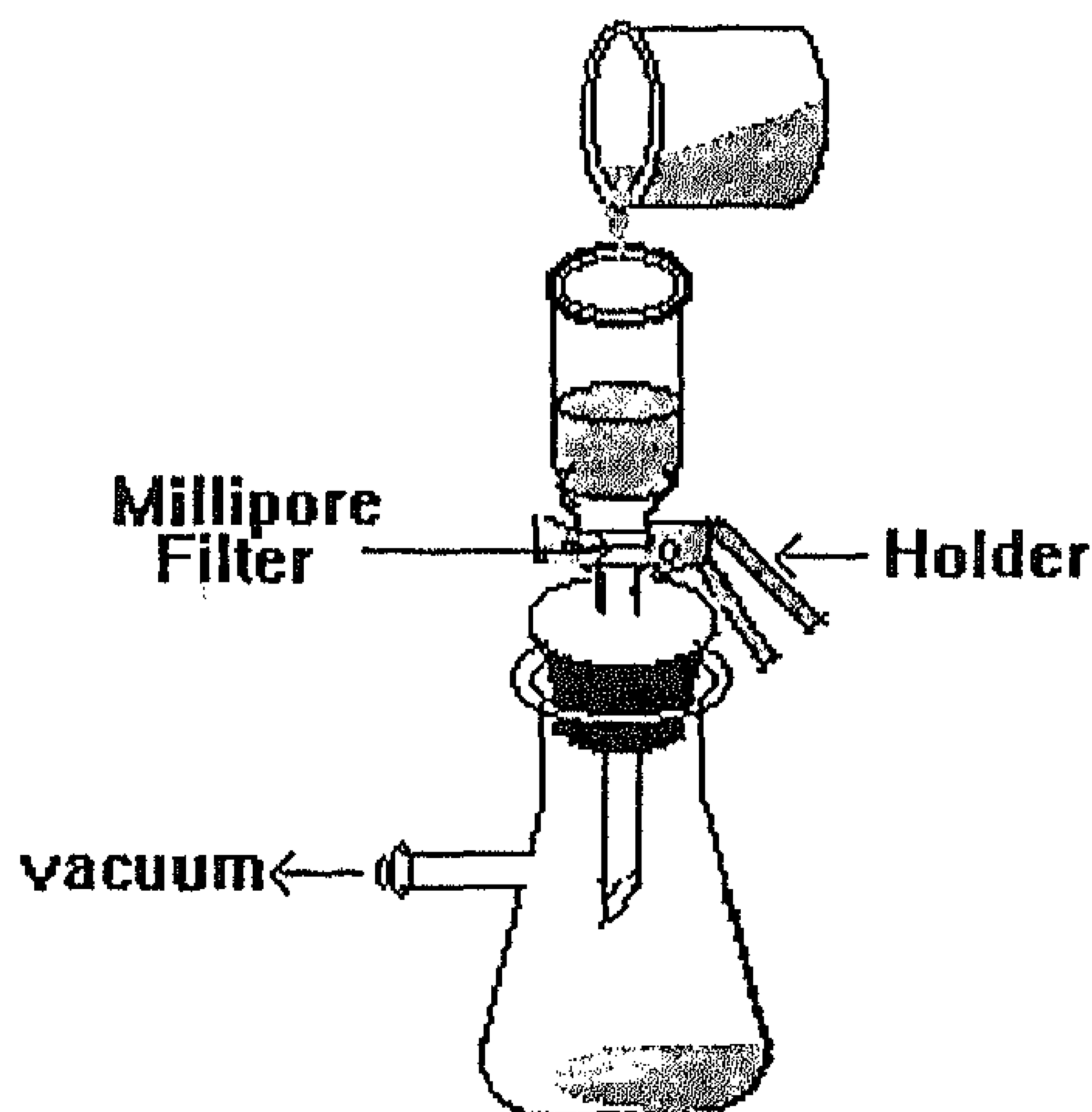
٣- المرشحات الغشائية أو المرشحات الجزيئية

Membrane or Molecular filter

عادة تفوق هذه المرشحات غيرها وذلك لسهولة إستعمالها والتخلص من الأغشية المستعملة فى الترشيح بعد إتمامه فلا يحتاج الجهاز لعمليات غسيل متكررة، كما توجد من الأغشية درجات مختلفة من المسامية يمكن إستعمالها وتتميز أيضاً بعدم إدمصاص المواد المراد ترشيحها على جزيئات المرشح٠ ومن أشهر هذه المرشحات وأكثرها إستعمالاً المرشحات التى تعرف بالمليبور Millipore filters ٠ والمرشح أى الغشاء المستعمل فى الترشيح عبارة عن غشاء رقيق مسامى مصنوع من مادة نقية خاملة من الناحية البيولوجية هى أسترات السليلوز Cellulose esters أو بعض المواد المشابهة لها٠

ويوجد من هذه الأغشية أنواع مختلفة تصل إلى ٢٠نوع تختلف تبعاً لسعة ثقوبها التى تتراوح بين ٠١,ــ٤ميكرون٠ ويتراوح قطر القرص المستعمل من ١٣مم ــ٢٩٣مم٠ وعادة تتماثل أقطار الثقوب الخاصة بالقرص والمجموعة MF type يوجد منها ١٢نوع مختلف يتراوح قطر ثقوبها بين ٠١, ـــ٨ ميكرون ويصل سمك القرص إلى١٣٥±١٠ ميكرون ومنها النوع GS type الذى يستعمل كثيراً فى أغراض التعقيم والدراسات البكتيريولوجية ومتوسط قطر ثقوبه ٢٢, ±٠٢, ميكرون وله معامل إنكسار يصل إلى٥١, ١ (يشبه معامل إنكسار الزجاج أو زيت السيذر) ويمكن تعقيمه بالأوتوكلاف بحيث لاتزيد الحرارة عن ١٢٥°م٠ وعادة توضع الأغشية أو الأقراص فى جهاز خاص Millipore filter holder (شكل٢٥) ويراعى تثبيته أيضاً فى دورق مخروطى زجاجى يوصل إلى مضخة التفريغ٠ وللغشاء إستعمالات أخرى ميكروسكوبية علاوة على إستعماله

فى التقدير الكمى للبكتيرات فى الماء أو فى بعض المواد الأخرى فبعد القيام بالترشيح يؤخذ الغشاء ويعامل بزيت السيدر Cedar wood oil حيث تمتلىء ثقوبه بالزيت ويصبح شفافاً وبذلك يمكن فحص الحبيبات التى تكون عالقة على سطحه ميكروسكوبياً بإستعمال العدسة الزيتية، وفى حالة التقدير الكمى للبكتيرات بالماء مثلاً يرشح حجم معين من الماء المراد فحصه خلال الغشاء فتسكن محتوياته من الخلايا البكتيرية على سطح الغشاء، ينزع الغشاء بعدئذ ويوضع على سطح ورقة ترشيح مشبعة ببيئة غذائية مناسبة فى طبق بترى معقم، يوضع بالحضان لفترة ٢٤ ساعة تظهر بعدها مستعمرات البكتيرات فوق المرشح حيث يمكن بعد ذلك تقدير عددها كمياً.



شكل ٢٥ : Millipore filter أ ـ قمع زجاجى ب ـ قاعدة زجاجية
جـ ـ قرص زجاجى مسامى يستند عليه المرشح الغشائى ءـ ماسك زنبركى.

إختبار كفاءة طرق التعقيم المختلفة

التمرين السادس عشر

١ـ استعمل جهاز الأوتوكلاف فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى (١٥رطل/بوصة^2 لمدة ١٥ دقيقة)٠

٢ـ استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة)٠

٣ـ استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة) مرتين فى يومين متتاليين٠

٤ـ استعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة) ثلاث مرات فى ثلاثة أيام متوالية٠

٥ـ رشح كمية من المرق المغذى باستعمال مرشح زايتس ثم انقل البيئة المرشحة إلى أنابيب ذات سدادات قطنية سبق تعقيمها وهى فارغة فى جهاز الأوتوكلاف٠

٦ـ ضع الأنابيب جميعاً بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ثم إفحصها٠

(تعكير البيئة يدل على عدم كفاءة طريقة التعقيم المستعملة)٠

طرق دراسة المزارع النقية

Pure culture techniques

عندما ندرس البكتيرات فى بيئاتها الطبيعية نتبين أنها تعيش فى مجاميع مختلطة، وفيما ندر ما توجد البكتيرات فى الطبيعة على صورة نقيه ذات نوع واحد فقط٠ولكى يمكن للدارس أن يتعرف على الخواص المورفولوجية المزرعية لنوع بكتيرى معين فمن الضرورى أولاً أن يفصل هذا النوع عن غيره من الأنواع أو غيره من الكائنات المتواجدة فى بيئته الطبيعية أو بمعنى آخر يجب الحصول على هذا النوع فى مزرعة نقية Pure culture ٠

توجد طريقتين رئيسيتين يمكن بواسطتهما الحصول على مزرعة نقية من أخرى مختلطة ، وهما كما يلى : أولا – طريقة تلقيح البيئات الصلبة بالأطباق تخطيطياً Streak plate method أو تعرف أيضا بأسم Loop dillution method ٠ ثانياً – طريقة صب البيئات الصلبة بعد تلقيحها بكميات ضئيلة من المزرعة المختلطة فى الأطباق وتعرف Pour plate method وكلا الطريقتين تعتمد على تخفيف تركيز الكائنات بدرجة يمكن معها تمييز مستعمرات مفرده من النوع الواحد من البكتيرات٠

وفى هذا التمرين سوف يقوم الدارس بفصل مكونات مخلوط من ثلاثة أنواع مميزة عن بعضها فى مزارع نقية من مزرعة سائلة بإتباع الطريقتين سالفتى الذكر وهذه الكائنات : *Serratia marcesens* (حمراء) ، *Micrococcus leutus* (صفراء) ، *Escherechia coli* (بيضاء) ٠

أولاً : طريقة تخطيط الأطباق

وتعتبر هذه الطريقة أفضل الطرق لتوفيرها للوقت وللأدوات اللازمة٠ ولكنها تتطلب مران من الدارس للحصول على نتائج جيدة حتى تصبح عادة مكتسبة لديه وفيما يلى الخطوات:ـ

التمرين السابع عشر (أ)

١- إبدء بمسح المنضدة التي تعمل عليها بالمحلول المطهر المتوفر لديك بالمعمل بإستعمال قطعة من الإسفنج٠

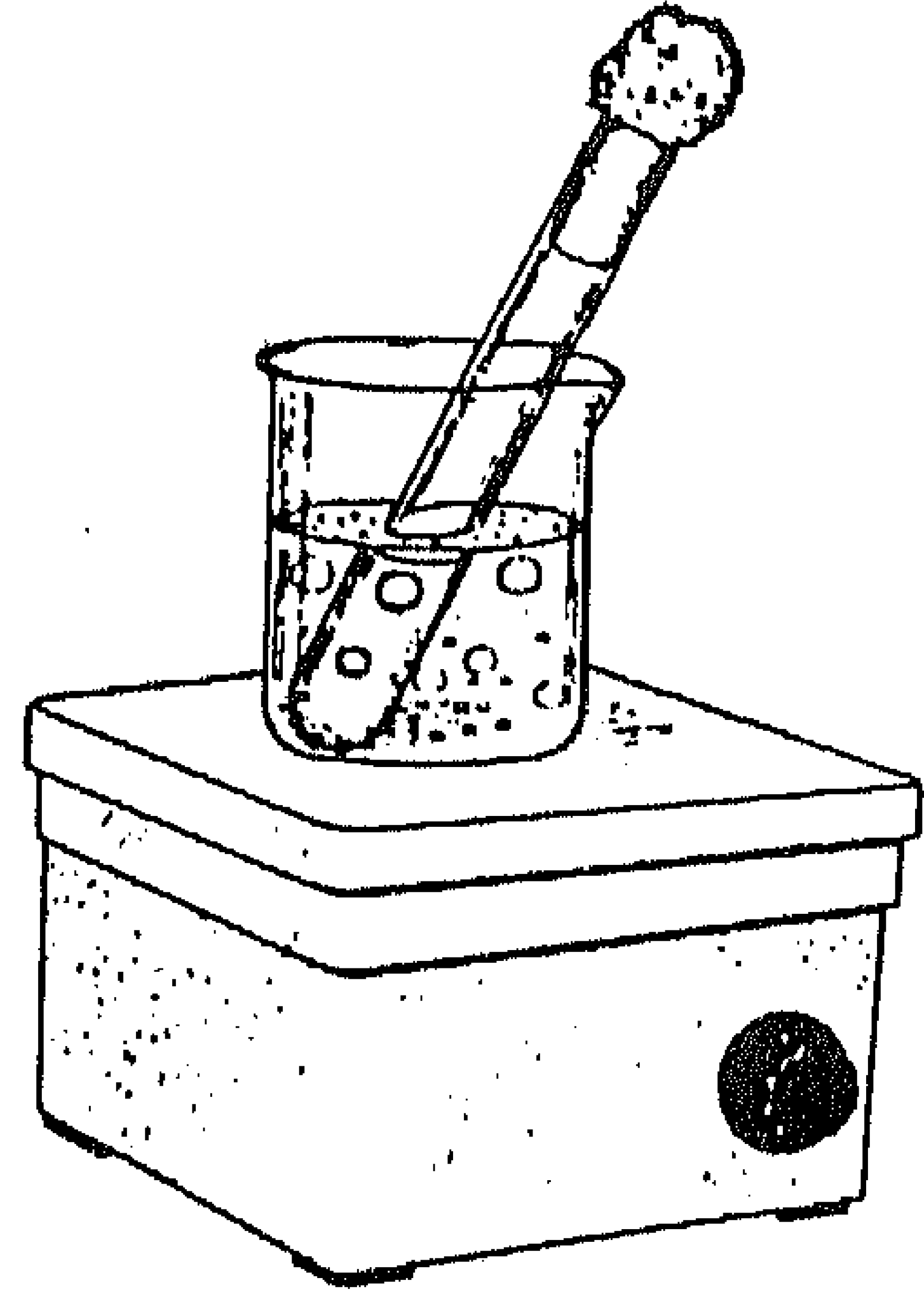
٢- ضع أنبوبتين من آجار مغذى عميق فى كأس محتوى على ماء وسخن الماء باللهب حتى الغليان وذوبان الآجار آجار- وأترك الكأس ليبرد إلى درجة ٥٠°م٠

٣- صب محتويات الأنبوبتين كل فى طبق بترى معقم ، راعى تسخين فوهة الأنبوبة قبل صب محتوياتها لقتل ما يكون على فوهتها من بكتيرات ملوثة، وبعد صب البيئة فى الطبق أغلقه بسرعة ثم حركه بحركة دائرية لتنشر البيئة على سطحه السفلى بإنتظام (لاحظ عدم وصول البيئة لغطاء وجانبى الطبق) ٠ يراعى عند صب الآجار أن لايكون مرتفع الحرارة حتى لا تتكثف المياه على غطاء الطبق ثم تتساقط قطرات الماء على الآجار بالطبق فتعمل على خلط المستعمرات الناتجة بعضها ببعض٠

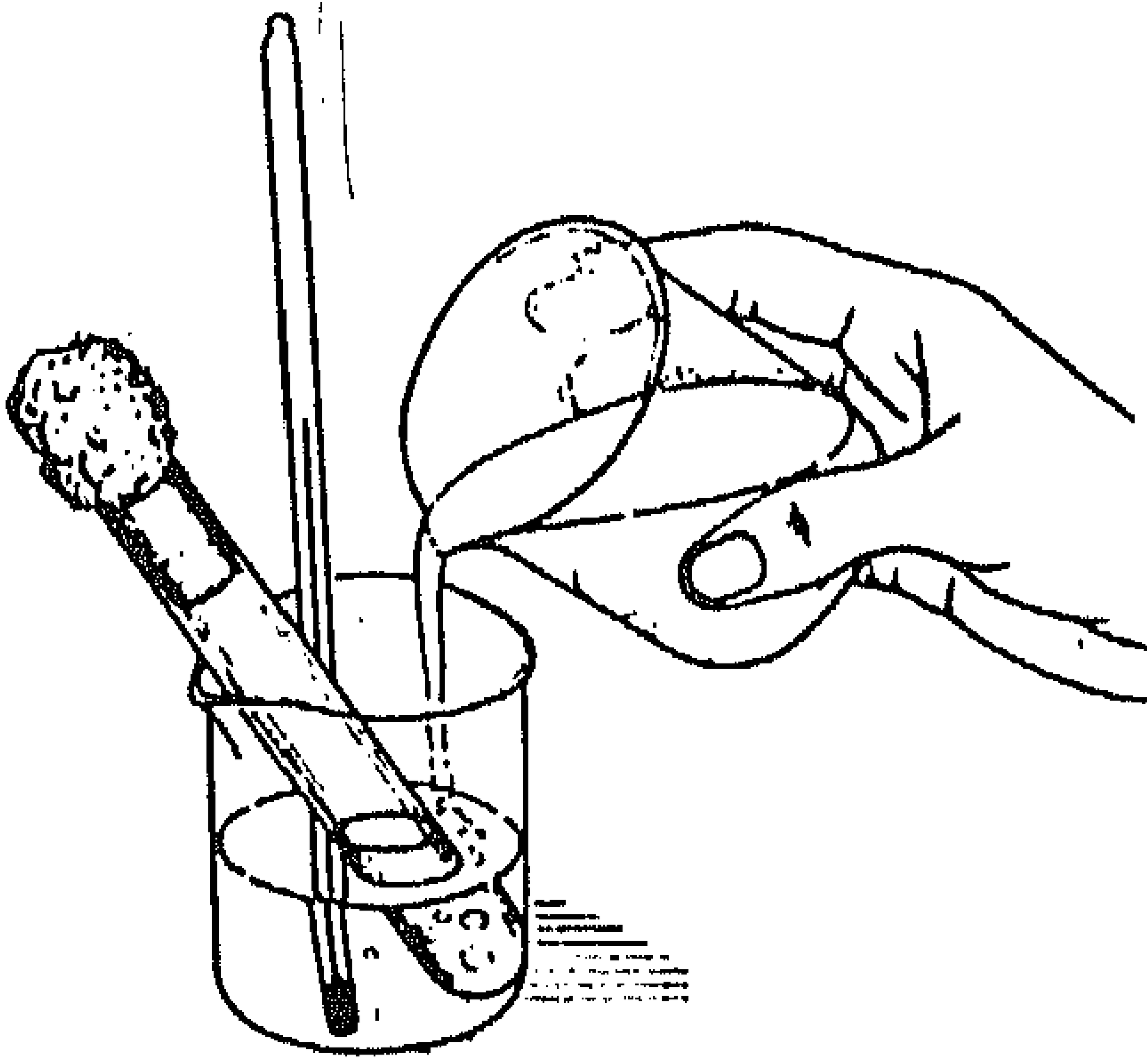
٤- أغمس الإبرة ذات الحلقة المعقمة فى المزرعة المختلطة السائلة (مخلوط من ثلاث بكتيرات السابق ذكرها) واستعملها فى التخطيط بأحد الطرق الآتية:-

طرق التخطيط :

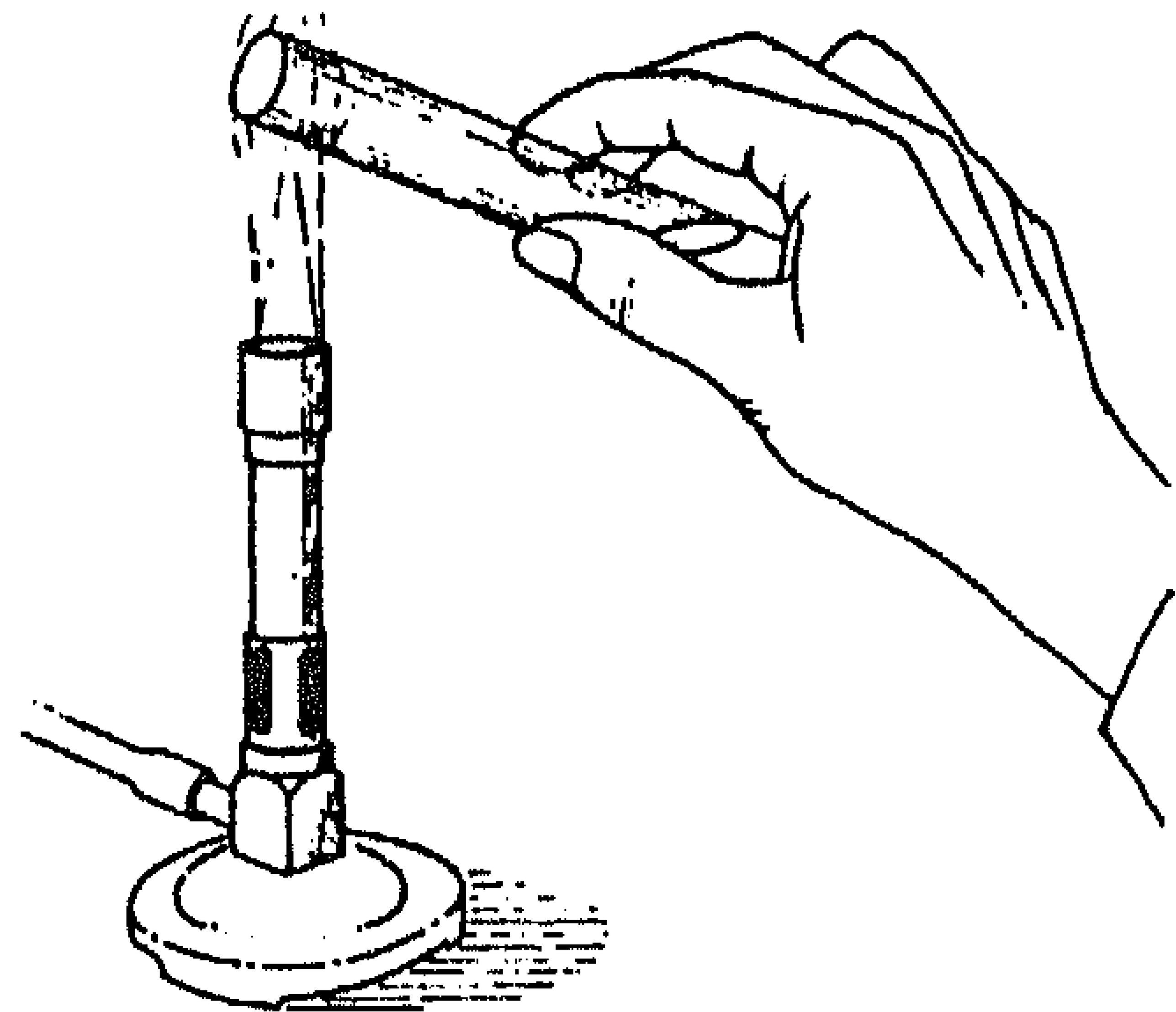
أ- التخطيط البسيط بالطبق Streak plate تجرى هذه الطريقة عندما يراد توفير المواد والوقت وعندما تزداد خبرة ومران القائم بها٠ حيث أن إتباع هذه الطريقة مع الباحثين المدربين تعطى نتائج ممتازة فى الحصول على مستعمرات مفردة يمكن عزلها من مزارع نقية٠ وتجرى بإتباع الخطوات السابقة الذكر شكل (٢٦ ، ٢٧)٠



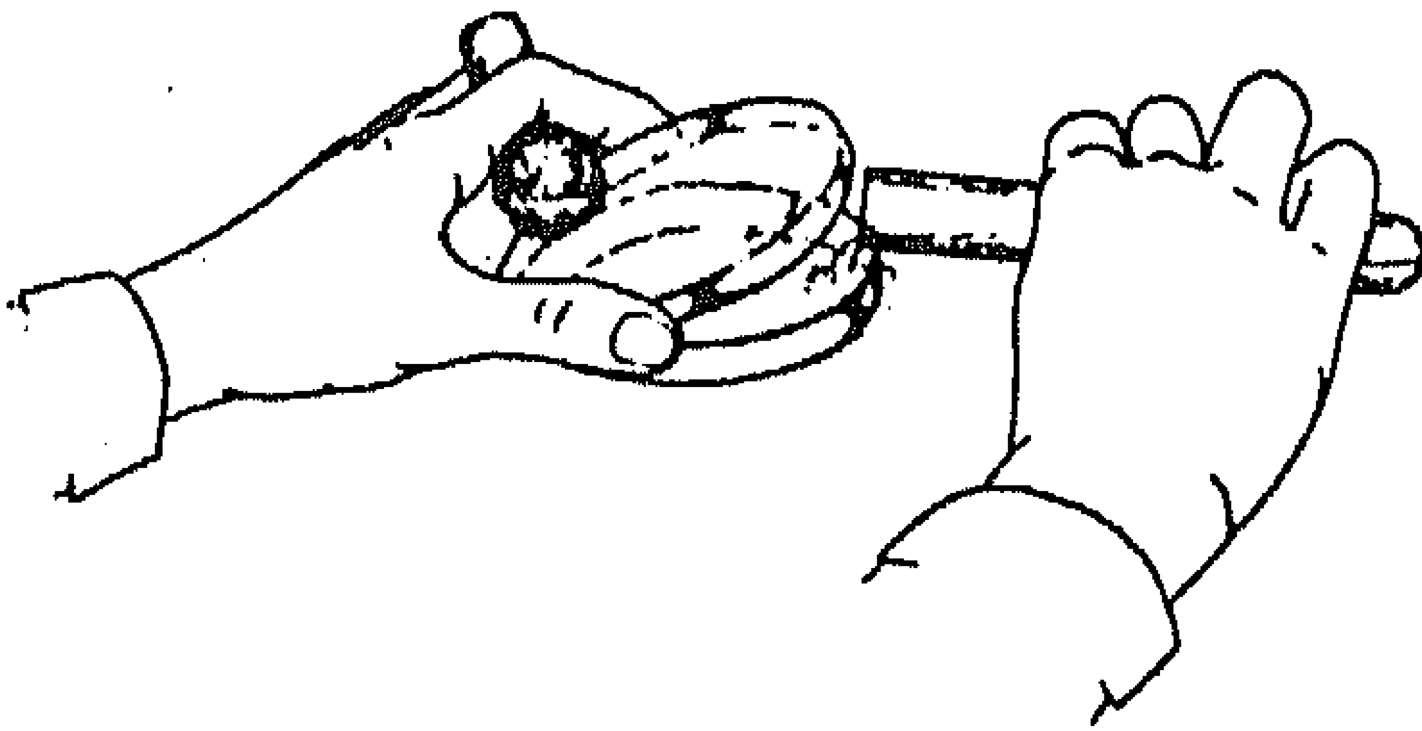
إسالة الآجار المغذى عن طريق الغليان
فى حمام مائى لمدة ٥ دقائق٠



برد الآجار المغذى لدرجة ٥٠°م
بواسطة إضافة ماء بارد٠

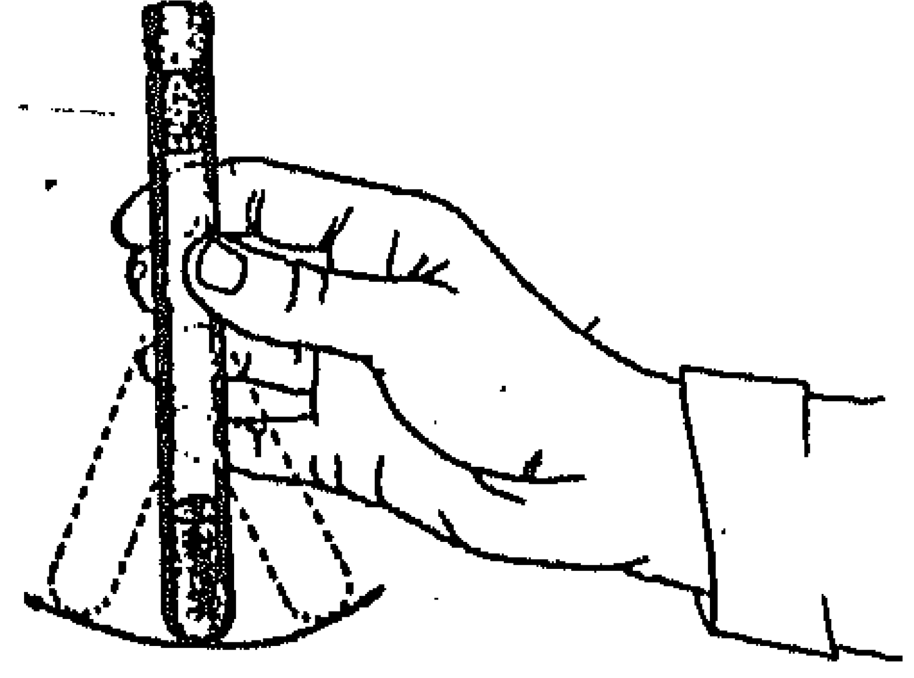


عقم فوهة الإنبوبه بعد إزالة
السدادة القطنية٠

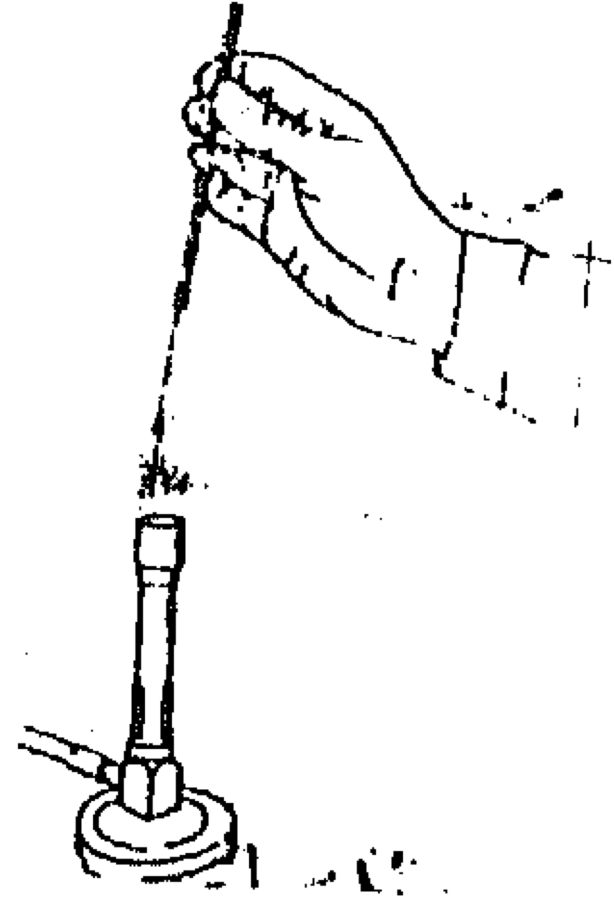


صب البيئة فى طبق بترى
وأترك الطبق يبرد٠

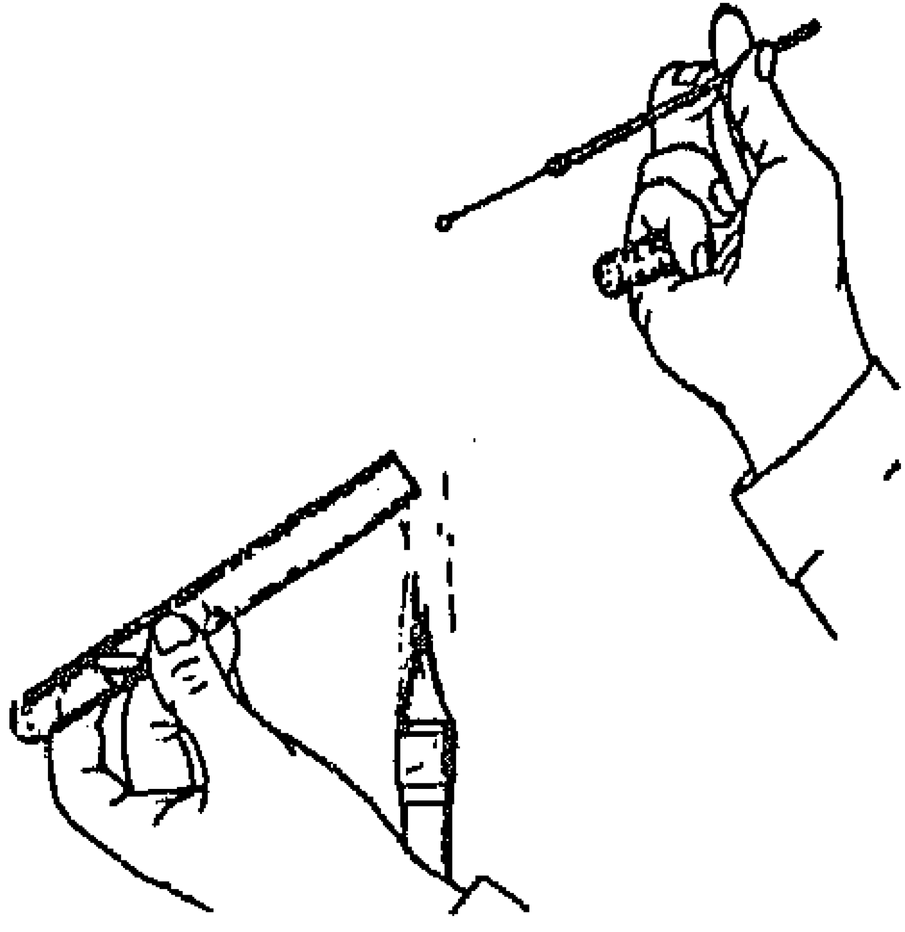
شكل ٢٦ : يوضح خطوات صب البيئه فى أطباق بترى٠



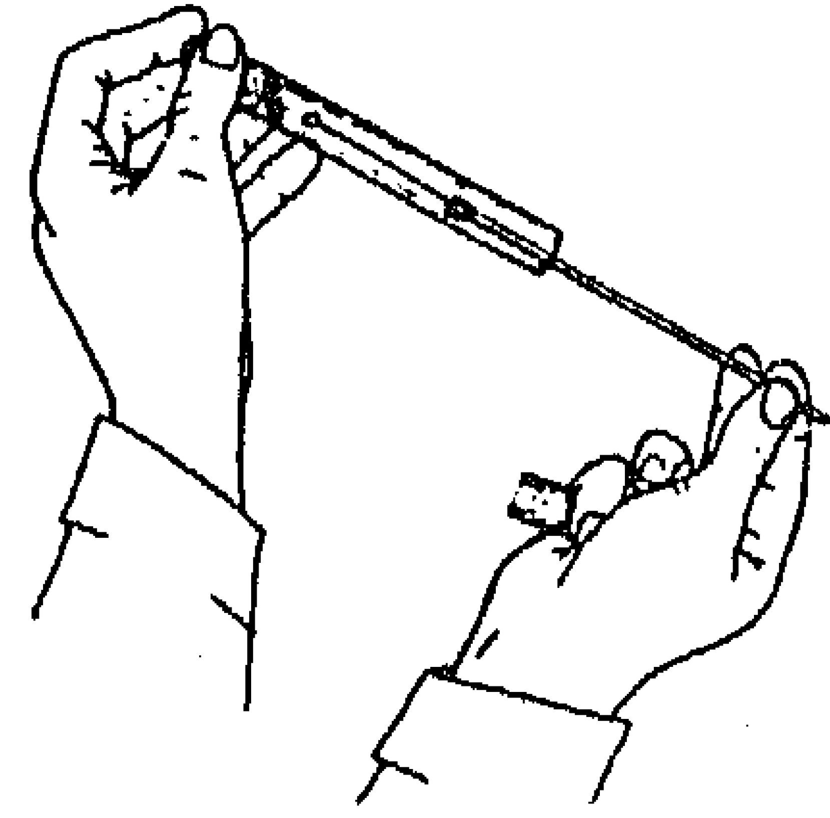
(١)حرك الإنبوبه يميناويسار ألحدوث توزيع متجانس للمعلق البكتيرى،



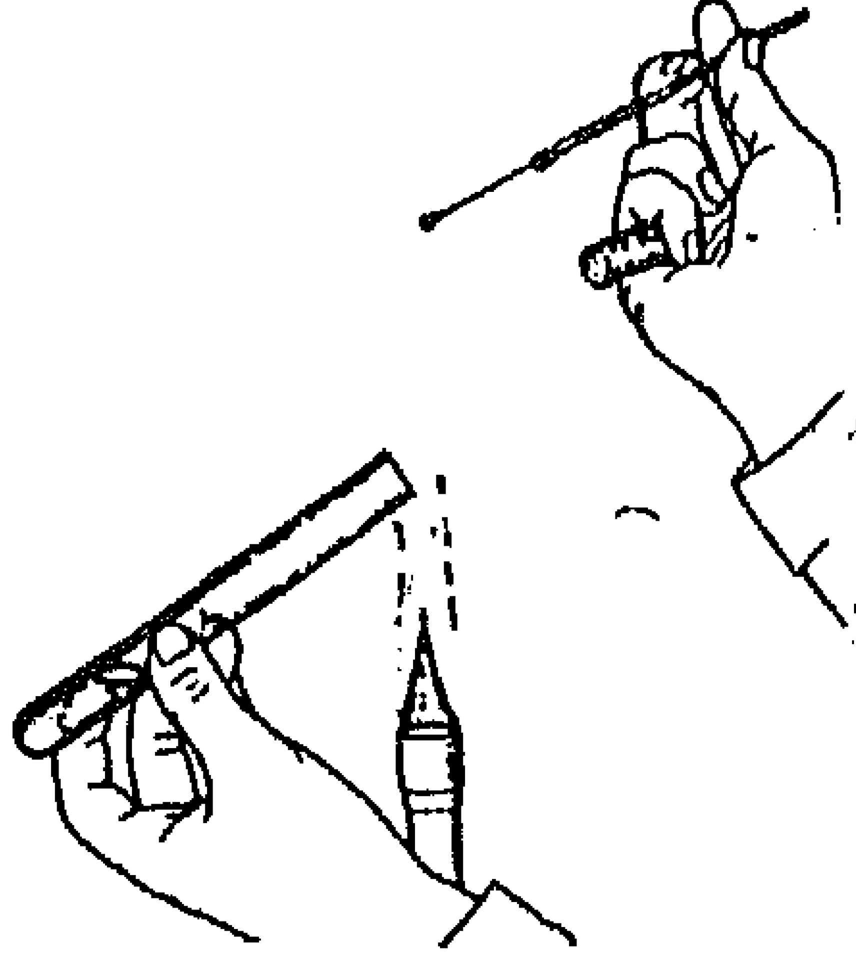
(٢) عقم الأبرة ذات العقدة بالهب المباشر،



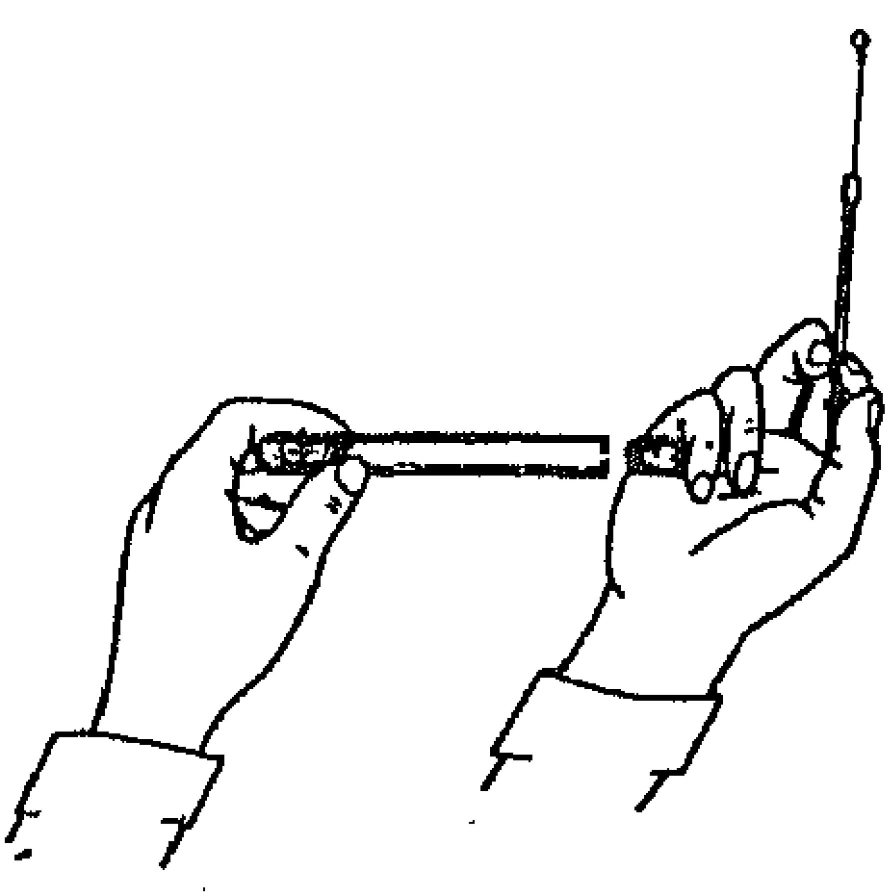
(٣) عقم فوهة الإنبوبه بعد نزع السدادة القطنية،



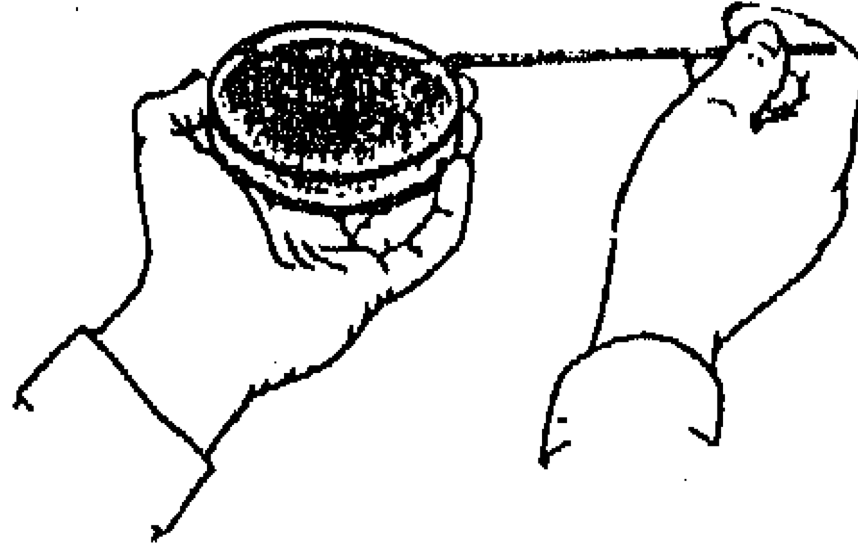
(٤) أغمس الابره المعقمه فى المعلق البكتيرى ،



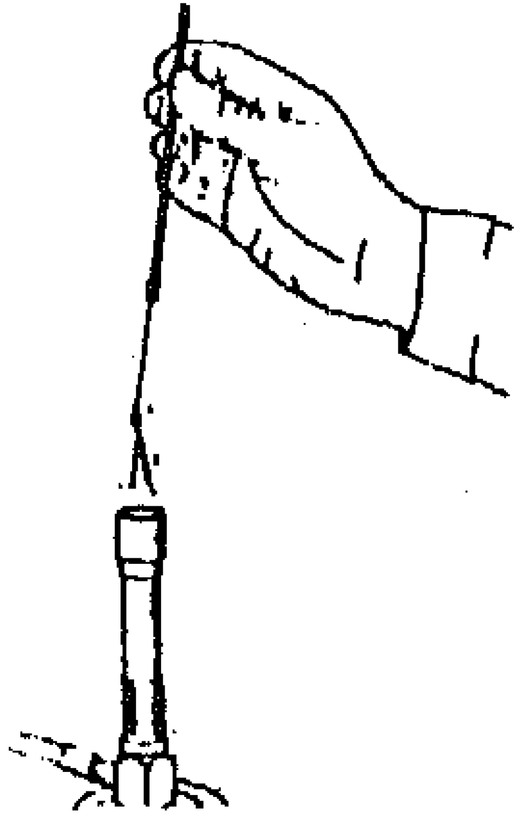
(٥) عقم فوهة الإنبوبه مره أخرى ،



(٦) ضع السدادة القطنية فى فوهة الإنبوبه،



(٧) خطط سطح البيئه بواسطة الإبره ذات العقده،



(٨) عقم الإبره بعد التخطيط،

شكل ٢٧ :خطوات إجراء عملية التلقيح،

ويخطط سطح البيئة بعد تصلبها بالطبق بعد نزع غطاءه وذلك بلمس حلقة الإبرة بسطح البيئة بخفة ثم يرسم خطوط مستقيمة متصلة من أحد جوانب الطبق إلى الجانب الآخر مع مراعاة السرعة وعدم تجرح سطح البيئة، ثم يغلق الطبق مباشرة (شكل ٢٨) ،

ب - **التخطيط البسيط المتكرر:** وتجرى هذه الطريقة بتخطيط الطبق أبتداء من رقم "١" ثم من رقم "٢" ثم من رقم "٣" شكل ٢٨ ،

جـ - طريقة التخطيط الرباعى Quaetrant streak

أ- يفرد اللقاح بالإبرة ذات الحلقة بسرعة فى منطقة صغيرة بجوار حافة الطبق (على سطح البيئة المتصلبة) وتعرف بالمنطقة رقم ١ ويراعى عدم خدش سطح الآجار ثم يغلق الطبق مباشرة،

ب - تعقم الإبرة ثم تترك لتبرد لمدة خمس ثوان ويخطط بها أربع خطوط متوازية تبدأ من المنطقة رقم واحد ومنتهية بالمنطقة رقم ٢ ثم يقفل الطبق مباشرة،

جـ - تعقم الإبرة مرة أخرى ثم تترك لتبرد ٥ ثوان وتجرى خمس خطوط متوازية مبتدأ من المنطقة ٢ إلى المنطقة ٣ ثم يقفل الطبق مباشرة،

ء- تعقم الإبرة وتترك لتبرد ٥ ثوان ويخطط بها أكبر عدد ممكن من الخطوط بادئاً من المنطقة رقم ٣ إلى المنطقة رقم ٤ شكل ٢٨ ،

هـ - عقم الإبرة قبل تركها،

د - طريقة التخطيط الشعاعى Radiant streak

أ- يفرد اللقاح بالإبرة ذات الحلقة بسرعة فى منطقة محدودة على سطح الآجار بجوار حافة الطبق ويغلق الطبق فوراً وتعرف بالمنطقة ١ ،

ب ـ تعقم الإبرة وتترك لتبرد ٥ ثوان ٠

جـ ـ من حافة المنطقة ١ يجرى من ٧ـ٨ خطوط فى إتجاه الحافة الأخرى من الطبق خطوط غير متوازية ويقفل الطبق فوراً٠

ء ـ عقم الإبرة ثم أتركها تبرد ٥ ثوان ثم تجرى عدة تخطيطات متعامدة مع الخطوط السابقة وموازية لبعضها ويقفل الطبق فوراً شكل ٢٨ ٠

هـ ـ عقم الإبرة قبل تركها على حاملها٠

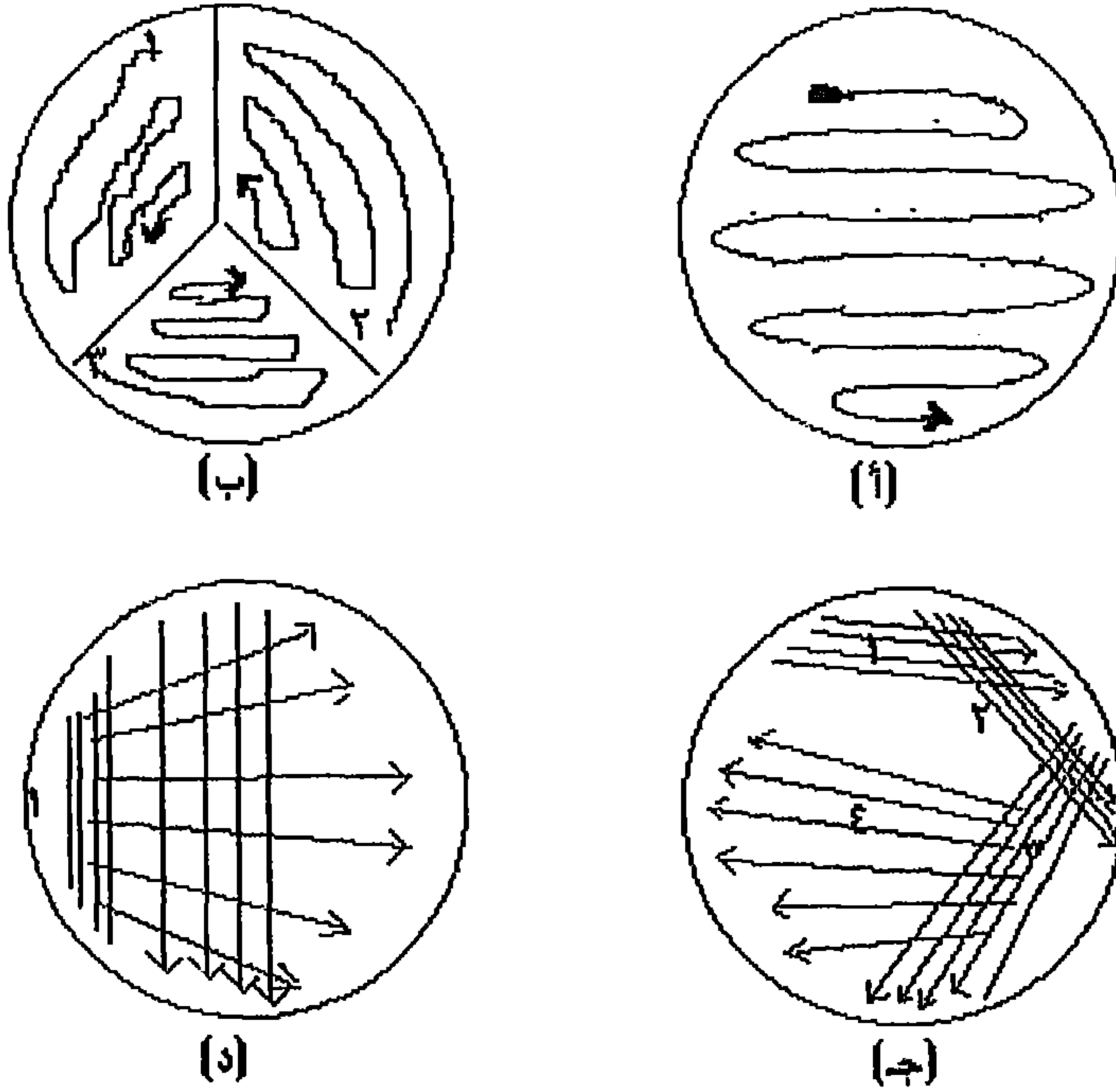
٥ـ توضع الأطباق السابق تلقيحها بالطرق الخمسة سالفة الذكر بالحضان وهى فى وضع مقلوب على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة والوضع المقلوب يسمح للرطوبة التى قد تتكون على السطح الداخلى لغطاء الطبق ألا تتساقط على سطح البيئة (المزرعة)٠

إختبار كفاءة طرق التخطيط المختلفة

التمرين السابع عشر (ب)

أترك الأطباق فى الحضان لمدة ٤٨ ساعة على درجة ٣٧°م ثم قارن النمو البكتيرى فى الأطباق المخططة بالطرق الثلاث٠

لاحظ أن نتائج كل طريقة تؤدى إلى ظهور مستعمرات فردية من الأنواع البكتيرية الثلاث المكونة للمخلوط٠ وبذلك تمكن كل من هذه الطرق الحصول على مزارع نقية بالعزل على آجار مائل٠



شكل ٢٧ : الطرق المتبعة فى تخطيط سطح الآجار ٠

طريقة الصب فى الأطباق Pour plate method

فى هذه الطريقة يجرى تخفيف ما تحمله حلقة إبرة التلقيح من المزرعـة المختلطة (المكونة من٣ أنواع) فى ثلاثة أنابيب مسالة فى الآجار المغذى بحيث تلقح كل أنبوبة من التى تليها٠ حتى يكون بالثالثة كمية من الخلايا تكفى لإعطـاء مستعمرات فردية٠ ومن مميزات هذه الطريقة أنها لا تحتاج إلى مهارة أو مـران سابق للحصول على نتائج جيدة شكل ٢٨ ٠ وفيما يلى خطوات التمرين٠

التمرين الثامن عشر

١ـ رقم أنابيب آجار عميق ١، ٢، ٣ بقلم Marker ثم ضعها فى كأس محتوى على كمية من الماء ثم ضعه على شبكة من السلك فوق مصباح بنزن حتى يسيل الآجار (شكل ٢٩) ٠

٢ـ علم قاع ثلاث أطباق بترى معقمة بنفس الأرقام٠

٣ـ برد البيئة إلى درجة ٥٠°م ثم لقح الأنبوبة رقم ١ بواسطة إبرة ذات حلقه ثم إخلطها جيداً بالبيئة (لاحظ تسخين فوهات الأنبوبتين قبل وبعد فتحهما)٠

٤ـ لقح الأنبوبة ٢ بواسطة إبرة معقمة ذات حلقة معبأه وحلقة مأخوذة من الأنبوبة ١ راعى تسخين فوهات الأنابيب قبل وبعد الفتح والتلقيح ثم رج الأنبوبة جيداً بين راحتى اليد وأعد الأنبوبة ١ إلى حمام مائى على درجة ٤٥ـ٥٠°م ٠

٥ـ لقح الأنبوبة رقم ٣ بعبوة حلقة مأخوذة من الأنبوبة رقم ٢ ٠إتبع نفس خطوات رقم ٤ ٠

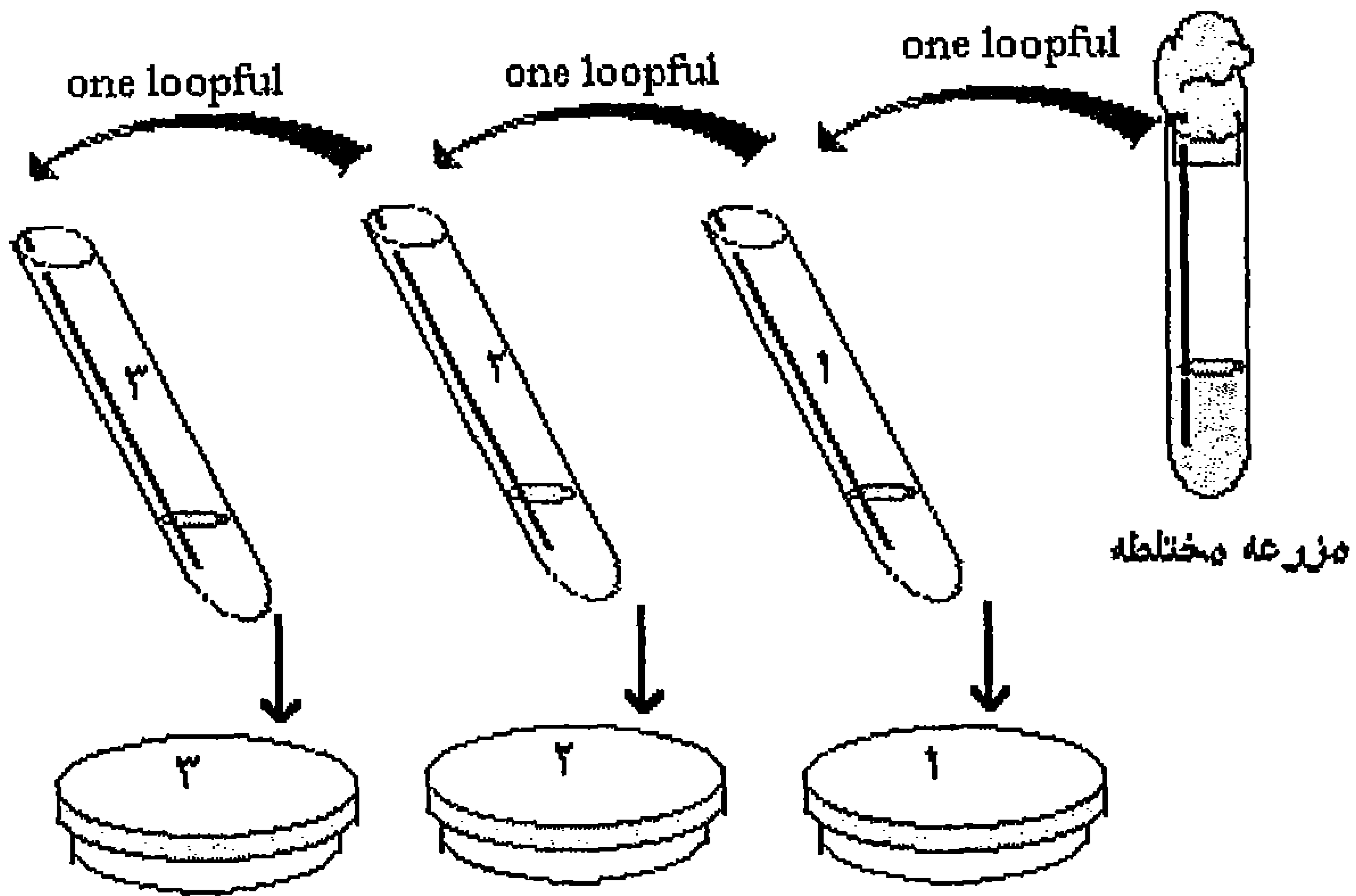
٦ـ صب محتويات الأنبوبة ٣ فى الطبق رقم ٣ يراعى عدم وصول البيئة إلى السدادة القطنية للأنبوبة٠

كما يراعى رج الطبق بحركة رحوية لتوزيع البيئة٠

٧ـ صب محتويات الأنبوبتين ١, ٢ فى الأطباق المناظرة بنفس الطريقة٠

٨ـ أترك الأطباق لتتصلب بهاالآجار ثم ضعها بالحضان مقلوبة على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة٠

٩ـ إفحص الأطباق ولاحظ مدى تباعد المستعمرات بعضها عن بعض٠ فى الطبق ١ لاحظ درجة تزاحم المستعمرات بمقارنتها بالطبق ٢ أو الطبق ٣ والأخير سوف يحتوى على مستعمرات متباعدة يمكن عزل كل منها على حدة والحصول على ثلاث مزارع نقية على آجار مائل لكل من الثلاث أنواع٠



شكل ٢٩ : طريقة الصب فى الأطباق.

التقدير الكمى للنمو البكتيرى
Quantitative measurements of Bacterial growth

بالرغم من أن دراسة الصفات المزرعية والمظهرية للنموات البكتيرية تعتبر من الدراسات الوصفية الهامة، إلا أن التقدير الكمى للنموات البكتيرية يعتبر أساساً لكثير من الدراسات الأساسية والتطبيقية.

فمثلاً تتخذ كمية النمو أساساً لتقدير تأثير كثير من المعاملات الفيزيائية أو الكيماوية على نمو البكتيرات وتكاثرها. كما تتخذ أساساً فى التقدير الحيوى للفيتامينات وبعض الأحماض الأمينية وفى قياس مدى نشاط الكائنات البكتيرية فى إحداث التغيرات الكيماوية لبعض مواد التفاعل المعينة وغير ذلك من الدراسات.

ولتقدير النمو تقديراً كمياً دقيقاً يوجد عديد من الطرق المختلفة فى أسسها والمتحدة فى أهدافها. ونظراً لإتساع مجال هذه الطرق فإن ذلك يتيح للدارس الفرصة فى إتباع الطريقة التى تتناسب مع إمكانياته.

أولاً: التقدير المباشر لعدد الخلايا Cell count

يمكن القيام بتقدير عدد الخلايا مباشرة فى عينة من المزرعة. وذلك بالإستعانة بالميكروسكوب وتتميز هذه الطريقة بسهولة إجرائها وسرعة الحصول على نتائجها. إلا أنها طريقة مجهدة للنظر رغم إستعمال أغشية بكتيرية مصبوغة لسهولة رؤية الخلايا.

هذا ومن الملاحظ أن العد المباشر للخلايا المثبتة والمصبوغة لا يميز بين الخلايا الحية والأخرى غير الحية. ولإجراء ذلك توجد عدة طرق.

(١) استعمال شرائح زجاجية خاصة:

التمرين التاسع عشر

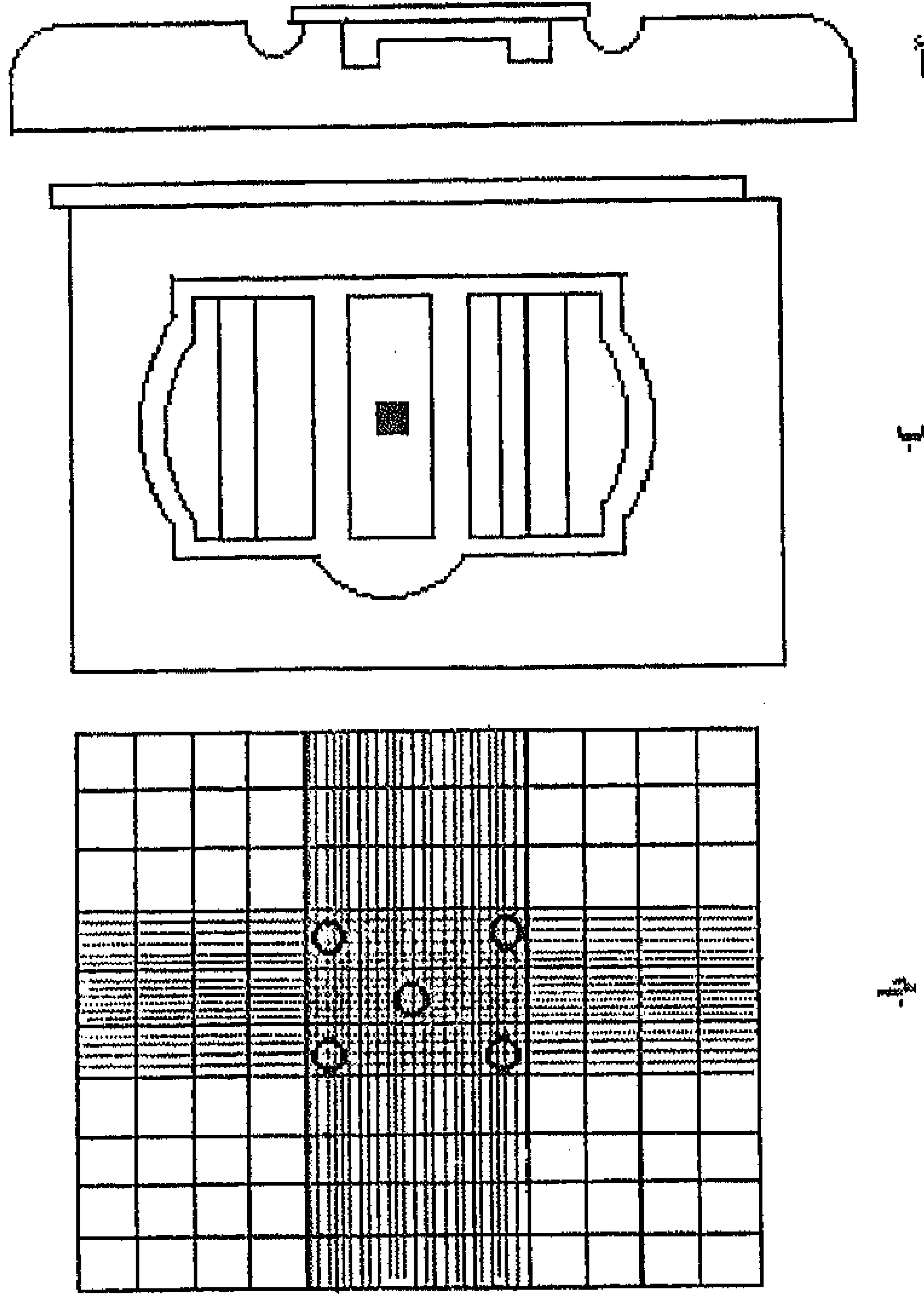
١ـ حضر مزرعة حديثة السن (٤٨ ساعة) من كل من *Bacillus subtilis , E.coli* نامية فى بيئة مرق مغذى٠

٢ـ حضر شريحة بتروف هاوسر Petroff-Hausser أو شبريحة قياسية لعد كرات الدم Haemocytometer وعدداً من أغطية الشرائح النظيفة٠ (تتميز هذه الشرائح بوجود حجرات صغيرة ذات حجم معين، كما تحتوى على تقسيمات دقيقة بشكل مربعات)٠

٣ـ إسحب بواسطة ماصة مدرجة معقمة كمية من المزرعة البكتيرية بعد رجها جيداً وضع بواسطتها بضع قطرات على سطح الشريحة لتكفى لغمرحجرة العد بالشريحة، ثم غطها مباشرة بغطاء شريحة نظيف٠

٤ـ إفحص الشريحة بالميكروسكوب يفضل إستعمال طريقة الحقل المظلم٠ قدر عدد الخلايا فى حوالى ٢٠٠ مربع ، يراعى عند العد حساب الخلايا تلك التى توجد فوق الضلعين المكونين للزاوية اليسرى من المربع٠

٥ـ قدر متوسط عدد الخلايا بالمربع الواحد ومنها يمكن عن طريق عملية حسابية، تختلف بإختلاف الشريحة المستعملة (شكل ٣٠)، تقدير عدد الخلايا فى٠, ١ مل من المزرعة البكتيرية المستعملة ٠



شكل ٣٠ : شريحة بيتروف-هاوسر Petroff-Hausser لتقدير عدد الخلايا البكتيرية، أ ــ قطاع طولى مستعرض للشريحة فى موضع يمر بمركز الشريحة، يلاحظ كيفية وضع غطاء الشريحة، ب ــ منظر عام للشريحة، المربع الغامق فى مركز الشريحة هو المنطقة المقسمة والمبينة فى جـ، حيث يقدر عدد خلايا البكتيرات فى عدد من المربعات المتماثلة كتلك المحددة بدوائر فى شكل جـ،

(ب) استعمال شرائح زجاجية عادية:

التمرين العشرون

١- حضر مزرعة حديثة السن من كل من *E.coli* , *Bacillus subtilis* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٤٨ساعة،

٢- حضر شريحتين عاديتين نظيفتين، ضع كل منهما فوق قطعة من الورق رسم عليها مربع مساحته ١سم^{2} بحيث يقع المربع فى منتصف الشريحة،

٣- رج أحد المزارع البكتيرية جيداً ثم أنقل كمية ٠,٠١ مل فى وسط المربع بأحد الشرائح بواسطة ماصة معقمة ومدرجة سعة ٠,١ مل، وبواسطة ماصة أخرى إنقل نفس الكمية من المزرعة الأخرى إلى وسط المربع فى

الشريحة الثانية (يمكن نقل الكمية بإستعمال إبرة زرع ذات عقدة سعتها ٠,٠١مل)٠

٤- إفرد ماتحمله العقدة على كل مساحة المربع بكل شريحة بواسطة إبرة التلقيح٠

٥- جفف الشريحة على سطح مستو دافيء بحيث يتم التجفيف خلال خمس دقائق٠ ثم ثبت الغشاء بالتمرير فوق اللهب ٠ (في حالة تقدير عدد البكتيرات باللبن تؤخذ كمية متساوية من اللبن ويحضر منها غشاء مثبت ولكن يزال ما يحتويه من دهن بتعريض الغشاء المثبت إلى الزيلول ثم يترك الغشاء ليجف بالهواء) ٠

٦- يصبغ الغشاء بصبغة أزرق الميثيلين لمدة نصف دقيقة ثم تغسل الشريحة بالماء وتجفف٠

٧- إفحص عشرة حقول مجهرية مسجلاً النتائج بطريقتين:

(أ) تقدير عدد جميع الخلايا بالحقل الواحد (المفردة والمتجمعة)٠

(ب) تقدير عدد الخلايا المفردة فقط بكل حقل٠

٨- إحسب عدد الخلايا في ١ مل من المزرعة الأصلية المختبرة ولإجراء ذلك تحسب أولاً مساحة الحقل الميكروسكوبي على أساس المعادلة (ط نق ^{٢}) ويمكن قياس قطر الحقل بالإستعانة بالميكروميتر العيني المعاير٠ ولما كانت كمية المزرعة المستعملة ٠,٠١ مل وهي تنتشر في مساحة ١سم^{٢} فإنه يمكن تقسيم هذه المساحة على مساحة الحقل المجهري فيمكن التعرف على عدد الحقول المجهرية في مساحة الغشاء٠ ومن حاصل ضرب متوسط عدد الخلايا البكتيرية بالحقل الواحد × عدد الحقول المجهرية، يمكن الحصول على عدد الخلايا في كمية ٠,٠١ مل من العينة المستعملة ٠ وبضرب الناتج ×١٠٠ نحصل على عدد الخلايا في ١مل من المزرعة أو العينة المستعملة٠

ثانيا: التقدير غير المباشر لعدد الخلايا

يمكن بهذه الطريقة تقدير عدد الخلايا الحية ذات القدرة على التكاثر تحت الظروف المناسبة لنموها، لذلك يجب استعمال البيئة الغذائية المناسبة، وتعرض المزرعة لظروف التحضين المثالية للنوع البكتيرى المراد تقدير عدد مستعمراته، ويجرى ذلك بإستعمال طريقة العد بالأطباق Plate count (شكل ٣١)٠

التمرين الواحد والعشرون

١- رج المزرعة البكتيرية النامية فى بيئة المرق المغذى جيداً لكى تتوزع بها الخلايا بإنتظام، ثم انقل ١مل منها بواسطة ماصة معقمة إلى أنبوبة تحتوى على ٩مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١٠:١ أى ١٠ $^{-١}$.

٢- رج المعلق المخفف جيداً بالأنبوبة ثم انقل منها ١ مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى أنبوبة تحتوى على ٩مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١: ١٠٠ أى ١٠ $^{-٢}$ ٠

٣- كرر الخطوة السابقة عدة مرات حتى تحصل على تخفيفات تصل إلى ١٠ $^{-٦}$ ، ١٠ $^{-٧}$ ، ١٠ $^{-٨}$ ، مستخدماً ماصة معقمة فى كل مرة٠

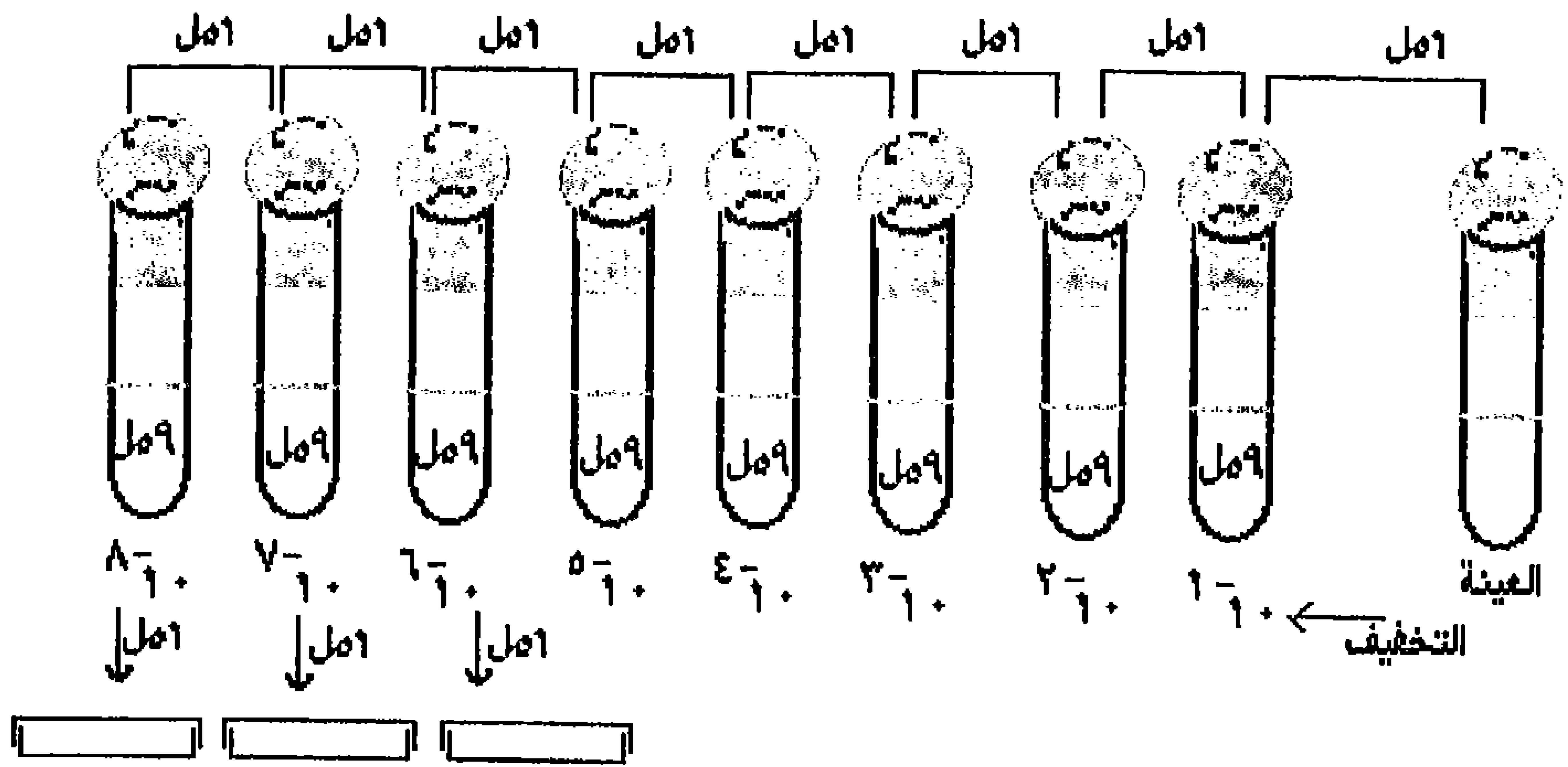
٤- أنقل ١مل من كل من التخفيفات الأخيرة ١٠ $^{-٦}$ ، ١٠ $^{-٧}$ ، ١٠ $^{-٨}$ ،إلى طبق بترى معقم مع مراعاة تحضير طبقين لكل تخفيف٠

٥- أضف إلى كل طبق كمية كافية (لاتزيد عن ١٥ مل) من بيئة الآجار المغذى المسالة والمبردة إلى درجة ٥٠°م، أخلط محتويات كل طبق جيداً وذلك بتحريكه إلى الأمام وإلى الخلف عدة مرات ثم أتركه ليتصلب٠

٦- ضع الأطباق فى الحضان فى وضع مقلوب على درجة ٣٧°م لمدة يومين٠

٧- انتخب التخفيف المناسب الذى يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة بالطبق الواحد•إحسب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد•

٨- احسب عدد الخلايا الحية فى ١ مل من المزرعة الأصلية وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات فى الطبق فى مقلوب التخفيف المستعمل به•



شكل ٣١ رسم تخطيطى يبين الخطوات المتبعة لإجراء تقدير النمو على أساس عدد الخلايا ذات القدرة على التكاثر (طريقة العد بالأطباق Plate count)•

ثالثاً : تقدير الوزن الجاف للخلايا

تقتضى بعض الدراسات تقدير النمو البكتيرى على أساس الوزن الجاف للخلايا بإعتبار أن الخلية البكتيرية تحتوى على ٩٠٪ ماء وهذه النسبة تختلف تبعاً للنوع البكتيرى• وعند تقدير الوزن الجاف للخلايا يجب التخلص من آثار البيئة النامية عليها بغسل الخلايا عدة مرات بالماء المقطر والمعقم•

التمرين الثانى والعشرون

١ـ جهز مزرعة من البكتيره *E. coli* نامية فى بيئة مرق مغذى لمدة ٢٤ ساعة٠

٢ـ رج المزرعة جيداً ثم أنقل منها كمية ١٠ مل إلى أنبوبة طرد مركزى نظيفة٠

٣ـ أفصل الخلايا عن البيئة بتشغيل جهاز الطرد المركزى بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق ، ثم تخلص من البيئة الرائقة فوق الخلايا٠

٤ـ أضف إلى الخلايا كمية ١٠ مل من ماء مقطر معقم، رجها جيداً لغسل الخلايا ثم افصل الخلايا بالقوة المركزية الطاردة بنفس السرعة ونفس المدة مرة ثانية ثم تخلص من الراشح٠

٥ـ كرر الخطوة السابقة مرة أخرى ليتم غسيل الخلايا ثلاث مرات ثم أضف للخلايا المغسولة والمترسبة كمية ١٠مل من الماء المقطر ورجها جيداً ثم أنقل أحجام موحدة منها (١مل) إلى بوانق سبق تثبيت وزنها بعيداً عن الرطوبة٠

٦ـ جفف العينات المأخوذة فى فرن الهواء الساخن على درجة ١١٥°م لمدة ١٢ ساعة٠

٧ـ إحسب وزن الخلايا الجاف فى المزرعة المستعملة وذلك على أساس عدد المليجرامات فى كمية ١,٠ مل من المزرعة٠

رابعاً: تقدير الآزوت الكلى بالخلايا

تعتمد هذه الطريقة على أن غالبية الخلايا البكتيرية تتكون من البروتين وحيث أن الآزوت هو أهم مكونات البروتين فإن تقدير الآزوت الكلى بالمزرعة أو بعينة منها يكون متلازماً مع كمية النمو (عدد وحجم الخلايا)٠ وعادة تقدر نسبة النيتروجين بالبروتين البكتيرى بحوالى ١٤٪ من الوزن الجاف للبروتوبلازم، هذا ويجب أن نعلم أن هذه النسبة ليست ثابتة للأنواع البكتيرية المختلفة وحتى فى النوع الواحد تحت مختلف الظروف البيئية٠

التمرين الثالث والعشرون

١ـ حضر معلق من الخلايا المغسولة وذلك باستعمال القوة المركزية الطاردة ثلاث مرات مع الغسيل بالماء المقطر المعقم فى كل مرة٠

٢ـ ضع ٢ مل معلق الخلايا المغسولة فى دورق كلداهل الدقيق سعة ٣٠ مل ثم أضف إليه ٢ مل من مزيج هضم البروتينات٠

٣ـ سخن محتويات الدورق حتى يتم ترويق المحلول ثم استمر فى الغليان الهادىء لمدة ساعة٠ بعد ذلك اترك المحلول ليبرد٠

٤ـ أضف ٥ مل من محلول مركز من الصودا الكاوية (١٠ أساسى) ثم أضف إلى المزيج كمية كافية من مادة مانعة للرغوة مثل حمض الأولييك أو مادة السيليكون٠

٥ـ أوصل الدورق فى الحال بجهاز تقطير صغير متصل بأنبوبة استقبال مدرجة تحتوى على ٢ مل حمض كبريتيك ٢٠/١ أساسى مع مراعاة غمر أنبوبة التوصيل أسفل سطح الحمض فى أنبوبة الإستقبال٠

٦ـ سخن للغليان لمدة ٥ دقائق ثم إرفع أنبوبة التوصيل فى الدقيقة الأخيرة من الغليان فوق سطح الحمض٠

٧ـ خفف المحلول الناتج بكمية معلومة من الماء المقطـر بحيـث يحتـوى المخلوط الناتج على ١٠ـ ١٥ ميكروجرام آزوت فى الملليليتر الواحد تقريباً٠

٨ـ أضف إلى كمية ٢ ملْ من السائل المخفف كمية مساوية (٢مل) من محلول نسلر Nessler solution ، ٣ مل من محلول الصودا الكاوية (٢ أساسـى) وذلك فى أنبوبة قياس اللون٠

٩ـ أترك الأنـابيب لمـدة ١٥ دقيقـة فـى درجـة حـرارة الغرفـة ثـم قـس درجة التلوين باستعمال جهاز تقدير الألوان Colorimeter مسـتخدماً موجـة ضوئيـة ذات طـول ٤٤٠ nm٠

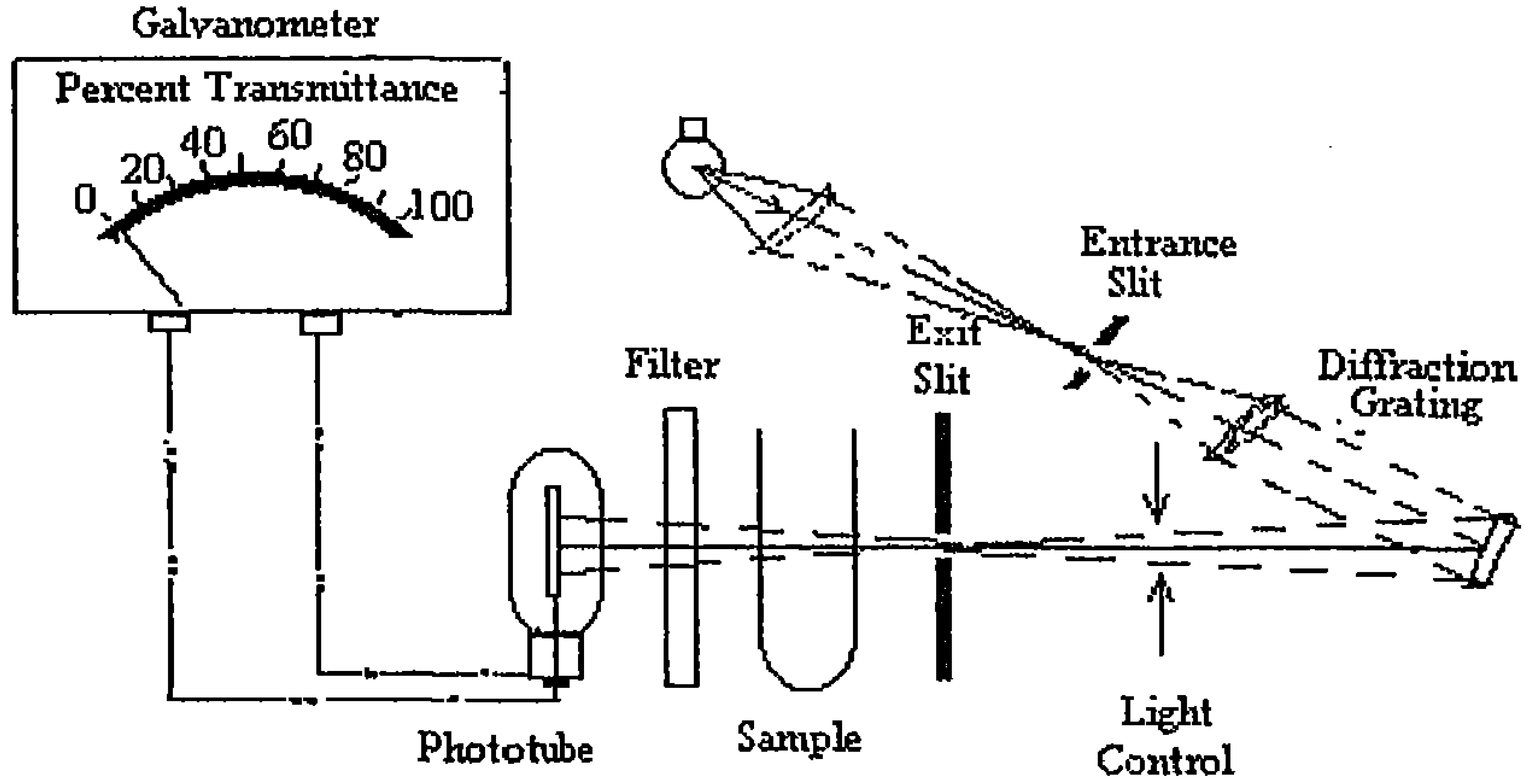
١٠ـ قدر آزوت الأمونيا بـالمليجرام /١مـل مـن المزرعــة البكتيريــة مستعيناً على ذلك بالرسم البيانى القياسى السابق تجهيزه باستعمال محـاليل من الأمونيا معروف محتوياتها من الآزوت٠

خامساً: تقدير درجة التعكير Turbidimetry

تعتمد هذه الطريقة على أنه كلمـا زادت درجـة تعكير المزرعـة (زيـادة كمية النمو) كلما قلت كثافة الآشعة الضوئيـة النـافذة خـلال هـذه المزرعـة٠ فـإذا استعمل جهاز لقياس الضوء النافذ خلال مزرعة بكتيرية سائلة أو معلق بكتـيرى فى ماء مقطـر فإنـه يمكـن قيـاس كثافـة الشـعاع النـافذ باسـتعمال وحـدة ضوئيـة حساسـة ويلاحـظ أن كثافـة الشـعاع تكـون متلازمةعكسـياً مـع درجـة تعكـير المزرعة٠ويستعمل لذلك أجهزة خاصة تقيس درجة عكـارة المـزارع والمحـاليل تعرف باسم Turbidimeters٠

وطرق قياس درجة التعكير من أكثر الطـرق المتبعـة فـى قيـاس النمـو البكتيرى كمياً وذلك لسرعتها ودقتها وقلة المعدات اللازمة إلا أنه يصعـب اتبـاع

هذه الطريقة فى حالة الخلايا الملونة بدرجة كبيرة أوالتىتفرز صبغات فى البيئـة بدرجة واضحة، وفى الحالة الأخيرة قد تستعمل طرق قياس بصرية أخرى مثـل Colorimetry أو Spectrophotometry(شكل ٣٢) وفــى كـل حالـة يراعـى إختيـار الموجة الضوئية المناسبة لكل نوع بكتيرى تبعاً للونه وهـى الموجـة التـى تكـون فيها درجة إمتصاص الخلايا أو المحلول أوالمعلق المستعمل أكبرما يمكن وتحـدد هـذه الموجـات أولاًبتعريـض المعلـق لعـدة موجـات ضوئيـة وذلـك باسـتعمال مرشحات ضوئية مختلفة ثم تختار الموجـة التـى يحـدث عندهـا أكـبر إمتصـاص ضوئى أى أقل نسبة٪ للنفاذية الضوئية٠



شكل ٣٢ : رسم تخطيطى للإسبكتروفوتوميتر

التمرين الرابع والعشرون

١ـ حضر مزرعة حديثة من البكتيره *E. coli* نامية فى بيئة سائلة ٠

٢ـ إمـلأ أحـد الأنـابيب الخاصــة بجهـاز قيـاس الضــوء Colorimeter بتخفيفـات معلومـة مـن المزرعـة بعـد رجهـا جيـداً، إمـلأ أنبوبـة أخــرى بالبيئــة

المستخدمة فى تنمية البكتيره المراد تقدير نموها. (١:١) - (١: ٢) - (١: ٤) - (١: ٨) - (١: ١٦) قدر درجة نفاذية الضوء Transmettance ٪ لكل تخفيف بالمقارنة بالبيئة.

٣- فى حالة استعمال بيئة عديمة اللون يستعمل مرشح ضوئى يعطى موجات ضوئية بطول ٤٢٠ mμ ، أما فى حالة استعمال بيئة صفراء أو بنية اللون يستعمل مرشح ضوئى يوفر موجات بطول ٦٠٠ mμ .

٤- دون قراءات الكثافة الضوئية للمزرعة Optical density وهذه القراءات تكون متلازمة طردياً مع درجة تعكير البيئة مع رسم خط بيانى بين هذه العلاقة.

وتبعاً لقانون Lambert & Beer فإن الكثافة الضوئية للمزرعة = ٢- لوغاريتم النسبة المئوية لدرجة نفاذية الضوء Transmittance٪ خلال المزرعة.

سادساً: تقدير درجة انتاج الحمض بالمزرعة

يقدر النمو كمياً عن هذا الطريق عادة فى بكتيره حمض اللاكتيك وغيرها من البكتيرات التى تتميز بإنتاج أحماض أثناء نموها بدرجة تكفى لقياسها.

التمرين الخامس والعشرون

١- حضر عدة مزارع من البكتيره *Lactobacillus bulgaricus* ونامية فى بيئة اللبن لمدة ١٢، ٢٤ ، ٤٨ ساعة .

٢- انقل ١٠ مل من كل مزرعة إلى دورق مخروطى نظيف، أضف إليها عدة نقط من دليل الفينولفيثالين.

٣- عادل حموضة العينة باستعمال محلول صودا كاوية ١/١٠٠ أساسى.

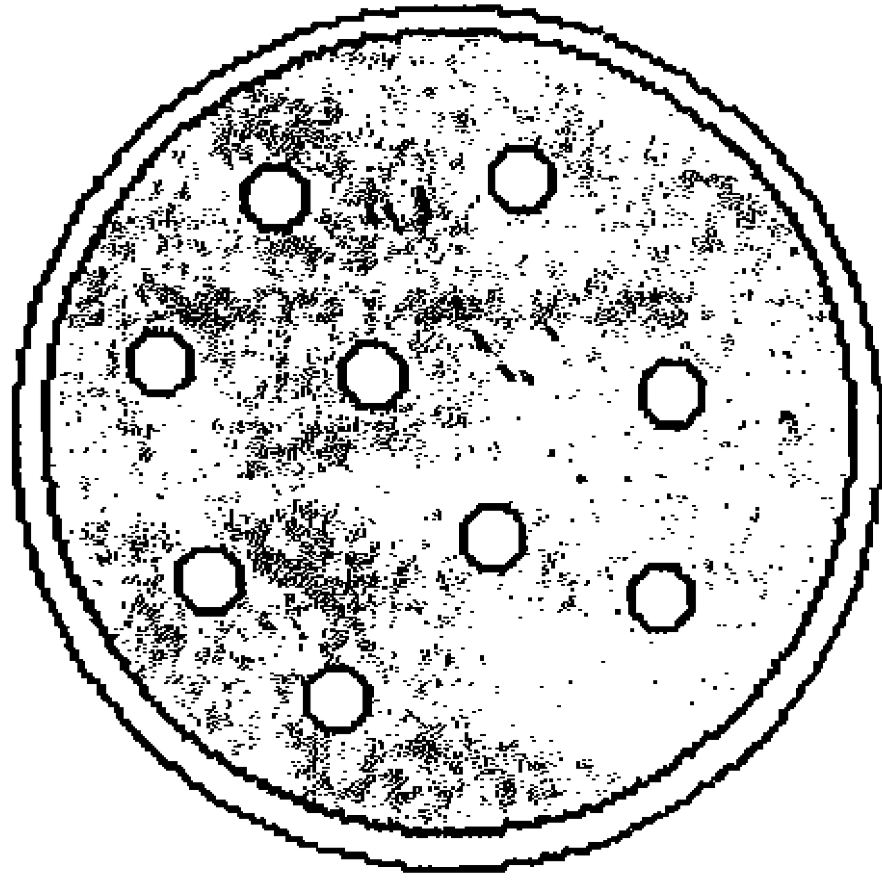
٤- احسب عدد ملليلترات الصودا الكاوية المستعملة وهى عادة تتناسب طردياً مع درجة حموضة المزرعة المختبرة.

عزل وتنمية البكتيريوفاجات

Bacteriophage isolation and culture

البكتيريوفاجات عبارة عن فيروسات تصيب الخلايا البكتيرية وتؤدى إلى موتها وتحللها • والفيروسات عموماً كائنات دقيقة جداً تعيش بداخل الخلايا الحية المصابة بها •

فإذا ما نميت مزرعة بكتيرية مع الفيروس الخاص بها على بيئة آجار مغذى فإن أهم مظهر لحدوث الإصابة بالفيروس هو ظهور مناطق رائقة (خالية من النمو البكتيرى) تعرف بالبلكات plaques (شكل ٣٣) وهذا نتيجة لإصابة الخلايا بهذه المناطق وتحللها كلية •وبالرغم من أن هناك عدد كبيرمن البكتيرات التى تصاب بالفيروسات الخاصة بها إلا أن أكثر البكتيرات دراسة من هذه الناحية هى البكتيره *E. coli* •وتعرف الفيروسات التى تصيبها باسم Coli phages – وحيث أن هذه البكتيره تعيش فى الجزء السفلى من القناة الهضمية للإنسان فإنها توجد هى والفيروسات المحللة لها فى مخلفات مجارى الصرف الصحى• وسوف نقوم فى هذا التمرين بمحاولة عزل هذه الفيروسات من هذا المصدر • ويتطلب ذلك ثلاثة خطوات الأولى (إثراء البيئة بجزيئات الفيروس enrichment) الثانية عملية ترشيح filteration والثالثة عملية تنمية وزرع seeding• لاحظ ان عملية إثراء البيئة بأعداد كبيرة من جزيئات الفيروس تتم فى بيئة خاصة قبل عملية الترشيح وفصل جزيئات الفيروس عن الخلايا البكتيرية•



شكل ٣٣ : ظهور المناطق الخالية من النمو البكتيرى (plaques) يدل على حدوث العلاقة التحللية lytic من الفاج والبكتيرة المختبرة•

التمرين السادس و العشرون

١ـ **عملية الإثراء** enrichment : تتم بأخذ عينة ٤٥ مل من مياه المجارى ثم يضاف إليها ٥ مل من مزرعة *E. coli* نامية لمدة ٤٨ ساعة و٥جم من بيئة Decca Strength Phage Broth المجففه والجاهزه ويحضن المخلوط على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة٠(راجع ملحق البيئات بآخر الكتاب)

٢ـ **عملية الترشيح:** وللترشيح السريع للمخلوط بعد فترة الحضانة يجب معاملته أولاً بالقوة المركزية الطاردة ، ونلاحظ ضرورة إعادة عملية الطرد المركزى حيث يتم فصل معظم الخلايا وجدرها حتى لا تسد الغشاء المستعمل فيما بعد للترشيح ونلاحظ أن تكون سرعة الطرد المركزى ٢٥٠٠ لفة/دقيقة ويستعمل غشاء millipore filter معقم بالإستعانة بالجهاز الخاص به (شكل ٣٤) ويرشح فيه السائل الناتج من عملية الطردالمركزى بالإستعانة بالتفريغ الهوائى من خلال الغشاء الدقيق المستعمل وإذا حدث أن انسدت مسام الغشاء أثناء العمل يجب تغييره حيث من الضرورى اعداد مجموعة منه جاهزة أثناء العمل وهذه الأغشية المستعملة عادة يكون لها ثقوب دقيقة جداً قطر كل منها مايقرب من ٤٥, ميللى ميكرون أو nm أو أقل وهذه تمنع مرور الخلايا البكتيرية أو جدرها ويسمح فقط لجزيئات الفاج Phage virions بالمرور خلالها (شكل ٣٤) ٠

زراعة الفاج Seeding

وللتأكد من وجود كمية كافية من جزيئات الفاج فى الراشح الناتج يجب أن يختبر على مزرعة غزيرة النمو من كل من *E. coli* والفاج نفسه والبيئة المستعملة لذلك هى بيئة الآجار المغذى النصف صلبة Soft nutrient agar (مرق مغذى+١/٢٪ آجار) وهذه البيئة عندما تتصلب تعطى قواماً جيلاتينياً يسمح

بتكوين المناطق الرائقة plaques بدرجة أفضل وطبقة الآجار الطرية هذه تصب فوق سطح بيئة آجار مغذى عادية ولآجراء ذلك تتبع الخطوات التالية:

تكرر عملية الطرد المركزى ٣ مرات على سرعة ٢٥٠٠ لفة / دقيقة٠	5ml. DSPB 5ml.E.coli $37^{0}C$. 24 hours إضافة ٥ مل من *E. coli* و٥مل من DSPB الى٤٥مل من مياة المجارى ويحضن المخلوط على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعه٠	
الحصول على الراشح المعقم فى دورق معقم٠	vacuum يرشح السائل الناتج من الطرد المركزى٠	vacuum يوضع غشاء الملليبور فى الجهاز الخاص به٠

شكل ٣٤ : يوضح عمليتى الإثراء و الترشيح للفاج٠

التمرين السابع والعشرون

أ- ضع أربعة أنابيب من الآجار المسال النصف صلب فى كأس محتوى على نصفه ماء ثم أغلى الماء حتى ينصهر الآجار - أترك الأنابيب بالماء الساخن حتى يبرد إلى درجة ٥٠ْم وضعها على سطح ساخن (شكل٣٥)٠

ب - علم الأنابيب برقم ١، ٢، ٣، ٤ ٠

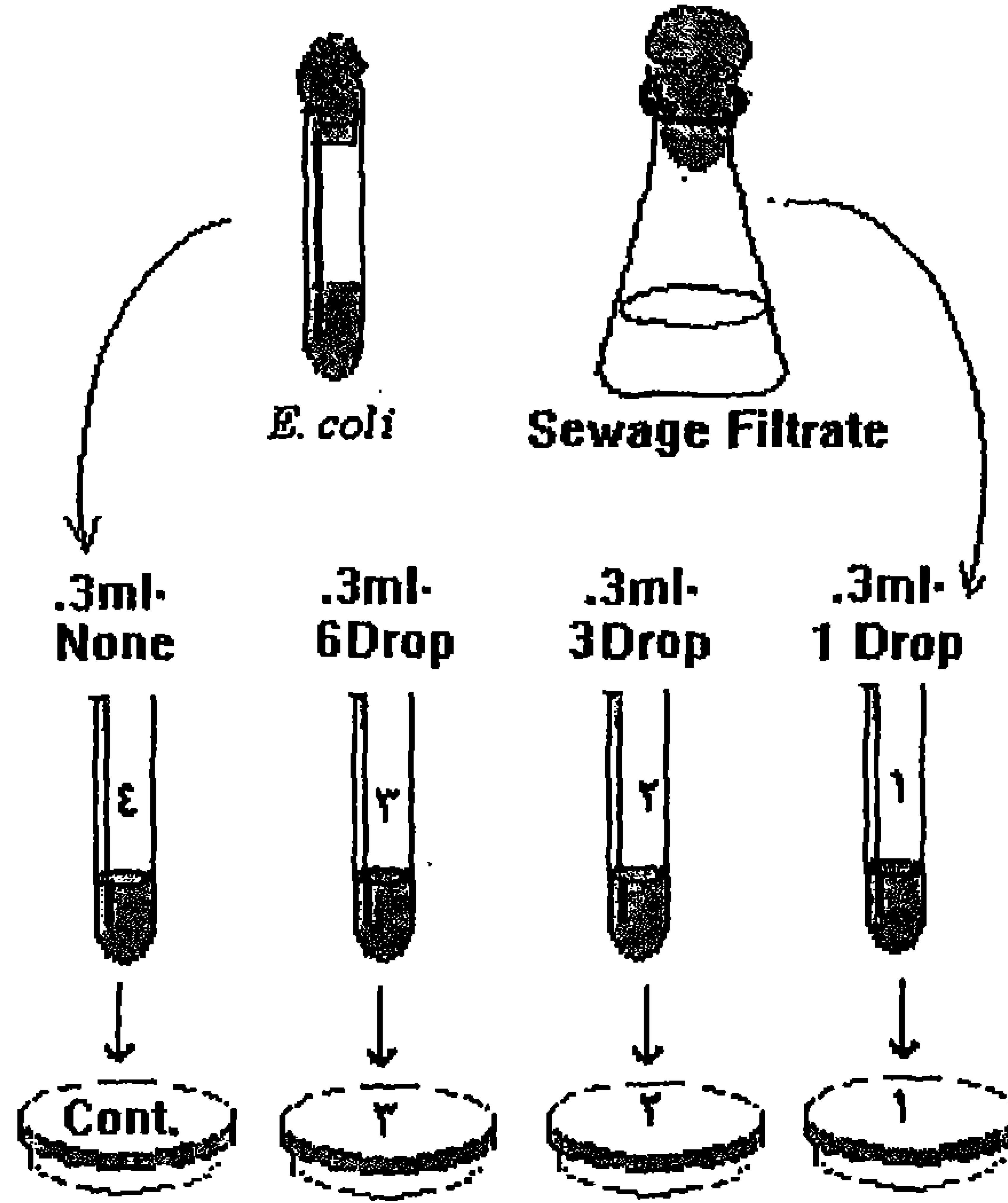
جـ - حضر أربعة أطباق معقمة وعلمها بنفس الأرقام ثم صب بها كمية من الآجار المغذى العادى المعقم وأتركها تتصلب (٢٪ آجار) ٠

د - باستعمال ماصة معقمة سعة ١ ميللتر أنقل نقطة من الراشح المعد سابقاً إلى الأنبوبة رقم ١ وثلاثة نقط من الأنبوبة رقم ٢ وستة نقط من الأنبوبة رقم ٣ وأترك الأنبوبة رقم ٤ دون إضافة٠

هـ - وباستعمال ماصة معقمة جديدة انقل ما يقرب من ٣, مل من مزرعة سائلة بعمر ٢٤ ساعة من *E. coli* إلى كل أنبوبة بما فيها الأنبوبة رقم ٤ ٠

و- وبعد تمرير فوهة كل أنبوبة على اللهب أنقل محتوياتها بعد رجها جيداً إلى الأطباق المناظرة فوق الآجار المغذى المتصلب٠ مع تحريك كل طبق حتى ينتشر البيئة الطرية بإنتظام على سطح الآجار المتصلب٠

ز- بعد أن تبرد الأطباق جيداً أنقلها إلى الحضان فى وضع مقلوب- ثم أفحص الأطباق كل ٦ساعات للبحث عن المناطق الرائقة ثم قسها وقدر قطرها٠



شكل ٣٥ : طريقة زراعة الفاج

- الأنابيب من ١ الى ٤ تحتوى على بيئة آجار نصف صلبه- تسال هذه البيئه وتحفظ فى حمام مائى على درجة حراره ٥٠°م ٠

- تصب الأنابيب النصف صلبة الملقحة على آجار مغذى فى الأطباق٠ تحضن الأطباق على ٣٧°م٠

العوامل البيئية وتأثيرها على النمو البكتيرى

يتأثر النمو البكتيرى بالعوامل البيئية المختلفة فى البيئـات الطبيعيـة ممـا يكون له دور واضح فى تأقلم ومعيشة هذه الكائنات •

وهـذه العوامـل قـد تكـون ذات طبيعـة فيزيائيـة physical كـالحرارة والضغط الأسموزى والحموضة والإشعاع والرطوبة والجفاف والتوتر السـطحى والتهويـة أو تكـون ذات طبيعـة كيماويـة كتـأثير الأيونـات السامة والأصبـاغ أو المطهرات أو ذات طبيعة حيويـة مثـل تأثرهـا بالكائنـات الحيـة المضـادة أو ممـا تفرزه من مضادات حيوية• أو مواد منشطة إلى آخره•

وفيما يلى بعض التمارين لإظهار الطرق القياسية للتعرف على تـأثير هذه العوامل•

أولاً العوامل الفيزيائية

١ـ تأثيرالحرارة:

تعتبر الحرارة أهم العوامل الفيزيائيـة تـأثيراً علـى الأنشطه الإنزيميـة البكتيريـة وعلـى نقيض الكائنـات ذات الـدم السـاخن فـإن البكتـيرات لا تحتفـظ بـالحرارة الناتجـة ولا تسـتغلها فـى تفاعلاتهـا الأيضيـة وعلـى ذلـك فـإن نظمهـا الإنزيمية تعتمد على حرارة البيئة•

وللإنزيمـات درجـات حـرارة مثاليـة optimum ودرجـة حـرارة دنيـا minimum وأخرى قصوىmaximum وهذه الدرجات من الحرارة مرتبطة أيضاً بالنمو البكتيرى• فعند الدرجة المثالية يكون النمو وكذلك النشاط الإنزيمـى علـى أشدهما أما عند الدرجة الدنيا فتعتبر أقل درجـة من الحـرارة ينمـو عليهـا النـوع البكتيرى وأى إنخفاض عنها يوقف النمو • وكذلك الدرجـة القصـوى فهـى أعلـى

درجة حـرارة يمكن عندها إستمرار النمو وإذا ارتفعت عن ذلـك يتوقـف النمـو وربما تموت الخلية ٠

أ. تحديد المجال الحرارى للنمو:

ويعتبر تقديـر هذه الدرجـات الثلاثـة لكل نـوع بكتيرى مـن التقديـرات الهامـة والمفيدة فـى أغـراض التعـرف والتصنيـف وعـن طريقهـا أمكــن تقسـيم البكتيرات إلى ثلاث مجاميع :

١. مجموعة محبة للحرارة المرتفعة Thermophilic

٢. مجموعة محبة للحرارة المتوسطة Mesophilic

٣. مجموعة محبة للحرارة المنخفضة Psycrophilic

وفيما يلى خطوات تقدير الدرجة المثالية لبعض البكتيرات :

التمرين االثامن والعشرون

١. لقح أنابيب اجارمغذى مائل مرقمه١،٢،٣ بكميات من كل مما يأتى: رقم١ـ *E. coli* أربعة أنابيب ورقم ٢ـ *Bacillus subtilis* أربعة أنابيب و رقم ٣ـ *Bacillus staerothermophilus* أربعة أنابيب ٠

٢. قسم الأنابيب إلى أربعة مجاميع كل مجموعـة ٣أنـابيب أنبوبـة لكل نوع بكتيرى٠

٣. ضع مجموعة فى حضان على درجة ٥٥ْم والأخرى بحضـان علـى درجة ٣٧ْم والثالثة بحضان على درجة حرارة الغرفة والرابعة فى حضان على درجة ٥ْم ٠ وأتركها لمدة ٢٤ ساعة٠

٤. افحص المزارع الناتجة فى أنـابيب كل مجموعـة ودون ملاحظـاتك عن وجود نمو من عدمه٠

ب ـ التأثيرات المميتة للحرارة Lethal effect of temperature

يتبع لذلك طريقتين :

الأولى تقدير الدرجة المميتة من الحرارة (TDP) Death Thermal Point وهو درجة الحرارة المميتة لخلايا البكتيره عندما تعرض لها لمدة ١٠ دقائق ٠

والثانية تقدير الوقت الحرارى المميت Thermal Death Time (TDT) والأخير هو الوقت اللازم لقتل محتويات معلق من الخلايا الخضرية أو الجراثيم عند درجة حرارة معينة ٠

وحيث أنه لا تموت كل الخلايا فى وقت واحد على درجة الحرارة المستعملة فى التقدير الأول (TDP) أو بعد التعرض لفترة معينة على درجة حرارة ثابتة فى التقدير الثانى (TDT) فإن هذين التقديرين ليسا بالتقديرات الدقيقة حيث يتدخل فى عملية الموت هذه عوامل أخرى مثل درجة تركيز أيون الأيدروجين بالمزرعة وكثافة المعلق البكتيرى المستعمل ٠

لذلك فيستعاض عن هذين التقديرين بتقدير آخر يعرف بمعدل الوقت الحرارى Thermal Death Rate (TDR) وهو أقل عدد من الخلايا الحية الذى يوجد بالمعلق أو المزرعة عند تعرضها لدرجة حرارة معينة لمدة ١٠ دقائق وفيما يلى خطوات إجراء هذا التقدير:

التمرين التاسع والعشرون

١ـ ضع ١ مل من مزرعة البكتيره *E. coli* نامية لمدة ٢٤ ساعة فى كل من ٥ أنابيب إختبار معقمة وفارغة ٠

٢ـ جهز حمام مائى وعلى درجة ٤٥°م ثم ضع به أحد الأنابيب وأتركها لمدة ١٠ دقائق ثم صب محتوياتها فى طبق بترى معقم ٠

٣- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٠ْم ثم ضع بها أحد الأنابيب الأربعة الباقية لمدة ١٠دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم٠

٤- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٥ْم وضع فيه أحد الأنابيب الثلاث المتبقية لمدة ١٠دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم٠

٥- أرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٦٠ْم وضع به أحد الأنبوبتين المتبقيتين وأتركها لمدة ١٠ دقائق ثم أفرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم٠

٦- أفرغ محتويات الأنبوبة المتبقية فى طبق بترى معقم دون تعريضها إلى أى معاملة حرارية٠

٧- صب فوق الأطباق كميات متساوية من بيئة الآجار المغذى المسالة على درجة ٤٥ْم ثم أخلط البيئة مع اللقاح بحركة رحوية٠

٨- عقب تصلب الآجار ضع الأطباق بالحضان ٣٧ْم بعد كتابة البيانات اللازمة على الأطباق وأتركها ٤٨ ساعة ٠

٩- قدر عدد المستعمرات الناتجة من كل طبق وقارن النتائج٠

الضغط الأسموزى والنمو البكتيرى

Osmotic pressure and Bacterial growth

يتأثر النمو البكتيرى بدرجة كبيرة بكمية الماءالخارجة والداخلة إلى الخلية٠ فعندما يكون الوسط خارج الخلية ذو ملوحة منخفضة hypotonic أى ينخفض فيه تركيز الأملاح عن تركيز السيتوبلازم الخلوى نفسه فينشأ ضغط أسموزى مرتفع بداخل هذه الخلية ، وبإستثناء بعض بكتيرات المياه المالحة فى البحاروالمحيطات فإن هذا التأثير يكون ضار بالخلية هذا والجدار الخلوى البكتيرى جدار صلب وقوى وعند الإنتفاخ الطفيف للخلايا نتيجة وجودها فى

محلول مخفف من الأملاح لا يتأثر هذا الجدار وتعرف الخلية حينئذ بأنها فى حالة أنتفاخ Swelling ، والعملية تعرف Plasmoptysis وإذا زاد الإنتفاخ قد تنفجر الخلايا وتموت٠

وإذا عكس الوضع ووجدت الخلية فى وسط مرتفع فى تركيزه من الأملاح (hypertonic) فإن النمو يتوقف تماماً٠ ويرجع ذلك إلى خروج الماء من سيتوبلازم الخلية بمعنى أنه يحدث تجفيف للسيتوبلازم وينكمش البروتوبلازم بداخل الخلية بعيداً عن النواه ويقال لمثل هذه الخلايا بأنها فى حالة بلزمة plasmolysis ويمكن لها أن تسترد ما فقدته من ماء إذا ما وضعت فى محلول متزن من الأملاح isotonic بمعنى أن هذا التأثير يمكن الرجوع فيه إذا ما أزيل العامل المؤثر٠

وبخلاف الخلايا النباتية والحيوانية فإن البكتيرات ليست حساسة للتغيرات البسيطة فى درجة الضغط الأسموزى للبيئة النامية عليها ولكن إذا زادت هذه التغيرات بدرجة كبيرة أثر ذلك على الخلايا البكتيرية ٠وتختلف البكتيرات فى درجة تحملها للضغوط الأسموزية المرتفعة، الأمر الذى أدى إلى تقسيمها إلى بكتيرات محبة للملوحة المرتفعة Halophilic وأخرى غير محبة للملوحة المرتفعة Nonhalophilic٠

ويجب أن نذكر هنا أن بعض الدراسات البكتيريولوجية قد تتطلب استعمال خلايا مبلزمة كمايحدث عند صبغ ودراسة الغشاء السيتوبلازمى للخلايا البكتيرية٠وفيما يلى خطوات إجراء تمرينان يبينان أثر الضغط الأسموزى:

التمرين الثلاثون (أ)

١ـ خطط أربعة أطباق بترى بها بيئة محتوية على تركيزات مختلفة من ملح الطعام بثلاث بكتيرات مختلفة فى درجة تحملها للملوحة، والبكتيرات هى:

Staphylococcus aureus و *E. coli* و *Halobacterium halobium*

والطبق الأول يحتوى على بيئة بها ٠,٥ ٪ كلوريد صوديوم

الطبق الثانى يحتوى على بيئة بها ٥٪ كلوريد صوديوم

الطبق الثالث يحتوى على بيئة بها ١٠٪ كلوريد صوديوم

الطبق الرابع يحتوى على بيئة بها ١٥٪ كلوريد صوديوم

٢ـ ضع الأطباق الملقحة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة ثم دون نتائجك عن حدوث النمو على خطوط التلقيح من عدمه،

التمرين الثلاثون (ب)

١ـ ضع كمية ١ مل من محلول سكر القصب (السكروز) ٤٠٪ فى كل من أنبوبتين معقمتين وفارغتين،

٢ـ أضف كمية ١ مل من محلول السكروز ٤٠٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من الأنبوبتين ليصبح تركيز السكر بهما ٤٪،

٣ـ كرر العملية ولكن بوضع ١ مل من محلول سكر السكروز ٤٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من أنبوبتين أخرتين ليصبح تركيز السكر بهما ٠,٤٪.

٤ـ كرر نفس الخطوات الثلاث السابقة باستعمال محلول كلوريد الصوديوم ٢٧٪ لتحضير مجموعتين من التركيزات المتسلسلة تبدأ من ٢٧٪ ثم ٢,٧٪ وينتهى ٠,٢٧٪ ،

٥- صب فى ستة أطباق بترى بها بيئة آجار مغذى مسال ومبرد لدرجة ٥٠°م ثم أتركه ليتصلب٠

٦- أقلب الأطباق وقسم قاعدتها إلى ٦ أقسام بواسطة قلم شمع٠

٧- ضع الأنابيب الست السابق تجهيزها مرتبة تبعاً لتركيزاتها ثم لقح أنابيب مجموعة واحدة من مجاميع السكروز أو ملح الطعام بمزرعة من البكتيره *E. coli* بعمر ٢٤ ساعة، ثم لقح أنابيب المجموعتين الأخرتين بمزرعة من البكتيره *Bacillus subtilis* بعمر ٧٢ ساعة٠

٨- لقح كل جزء من أجزاء أحد أطباق بترى المعلمة مباشرة بعد الخلط بلقاح كل أنبوبة المكونة لكل مجموعة٠

٩- كرر نفس العمليات بعد مرور ساعة على وضع الخلايا فى المحاليل السكرية والملحية٠

١٠- كرر نفس الخطوات السابقة ولكن بعد مرور ٢٤ ساعة من خلط الخلايا فى المحاليل السكرية والملحية٠

١١- دون النتائج فى جدولين جدول خاص بالمحاليل السكرية، والآخر بالمحاليل الملحية٠

٢- تأثير تركيز أيون الأيدروجين Effect of ion concentration

يأتى درجة تركيز أيون الأيدروجين فى البيئة فى المرتبة الثانية بعد الحرارة فى تأثيره على النمو البكتيرى٠

وتركيز أيون الأيدروجين الذى عادة يعبر عنه بدرجة pH (log 1/H+) يؤثر على نشاط الإنزيمات التى تؤدى جميع وظائف الخلية النباتية وغير النباتية٠

يتأثر النمو البكتيرى بدرجة كبيرة بالتغيرات فى تركيز أيون الأيدروجين بالبيئة النامى عليها، وكما هو الحال من ناحية المتطلبات الحرارية، فإن لكل نوع بكتيرى درجة مثالية Optimum من تركيز أيون الأيدروجين يكون النمو

عندها أكبر ما يمكن، كما أن له درجة عظمى Maximum وهى أقصى درجة يحدث عندها نمو، وأن أى زيادة فى تركيز أيونات الأيدروجين عن هذه الدرجة تمنع النمو .

وكذلك نجد أيضاً أن لكل نوع بكتيرى درجة دنيا Minimum ، وهى الدرجة التى إذا انخفض عنها تركيز أيون الأيدروجين يتوقف النمو كلية، ويجب أن نعلم أن هذه الدرجات الثلاث من تركيز أيون الأيدروجين والخاصة بكل نوع بكتيرى ليست ثابتة بل تتأثر كثيراً بعوامل عديدة منها، درجة الحرارة وتركيب البيئة، والضغط الأسموزى وعموماً فإن البكتيرات فيما عدا عدد قليل منها تتطلب تركيز متوسط من أيون الأيدروجين بمعنى أنها تتطلب بيئات متعادلة .

وفيما يلى خطوات تمرينان للتعرف على تأثير الـpH :

التمرين الواحد والثلاثون (أ)

١ـ حضر المحاليل الآتية محلول ٠,٢ جزيئى من فوسفات ثنائى البوتاسيوم ومحلول ٠,١ جزيئى من حمض الستريك ومحلول ٠,٢ جزيئى حمض بوريك ومحلول ٠,٢ جزيئى صودا كاوية .

٢ـ جهز مجموعة من المحاليل المختلفة فى قيمة الـpH وذلك بخلط كميات من المحاليل السابقة طبقاً للنظام المبين بالجدول (٦) .

٣ـ عقم الأنابيب المحتوية المختلفة فى درجة الـ pH فى معقم أرنولد بطريقة التعقيم المتقطع .

٤ـ لقح كل أنبوبة بلقاح من مزرعة *E. coli* عمرها ٢٤ ساعة .

٥ـ ضعها فى حضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٦ـ لاحظ النمو بتقدير كمية التعكير التى تحدث بالبيئة دون رجها .

٧ـ دون ملاحظاتك فى جدول مبيناً درجة التعكير مستعيناً بالقياسات التالية:

- = لا يوجد عكارة	+ = عكارة خفيفة
++ = عكارة متوسطة	+++ = عكارة شديدة

(جدول٦) : طريقة تحضير بيئات زرع متدرجة فى تركيز أيون الإيدروجين.

فوسفات ثنائى البوتاسيوم ٢, جزيئى (سم^{٣})	حمض الستريك ١, جزيئى (سم^{٣})	بيئة مرق مغذى (سم^{٣})	الحجم الكلى (سم^{٣})	قيمة الـ pH بالتقريب
٠,٣	١,٧	٨	١٠	٢,٨
٠,٦	١,٤	٨	١٠	٣,٦
٠,٩	١,١	٨	١٠	٤,٤
١,١	٠,٩	٨	١٠	٥,٢
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٦,٠
١,٥	٠,٥	٨	١٠	٦,٨
١,٩	٠,١	٨	١٠	٧,٦
حمض بوريك ٢، جزيئى (سم^{٣})	**صودا كاوية ٢، جزيئى (سم^{٣})**	**بيئة مرق مغذى (سم^{٣})**	**الحجم الكلى (سم^{٣})**	**قيمة الـpH بالتقريب**
١,٧	٠,٣	٨	١٠	٨,٤
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٩,٢
١.٠	١,٠	٨	١٠	١٠,٠

التمرين الواحد والثلاثون (ب)

١ـ جهز تسعة أنابيب مرق مغذى كل ثلاثة منها تختلف فى قيمة الـpH ثلاثة ذات رقم (١) pH 5.0 ،ثلاثة رقم (٢) pH 7.0 ،وثلاثة رقم (٣) pH 9.0 •

٢ـ لقح الثلاث أنابيب ذات الـpH الواحد بكل من ثلاثة بكتيرات هى مزارع مرق مغذى *E.coli , Staphylococcus aureus , Sporosarcina ureae* •

٣ـ ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة•

٤ـ قدر درجة العكارة فى الأنابيب المختلفة بالعين المجردة •

٣ـ تقدير الإحتياجات الأوكسوجينية

تختلف البكتيرات فى حاجتها من الأكسجين من حيث هوائية إجباراً Strict aerobes وهى التى لا تنمو فى غياب الأكسجين ، وغير الهوائية إجباراً Strict anaerobes وهى التى لا تنمو فى وجود الهواء وبين هذين النقيضين توجد مجاميع إختيارية Facultative وهى التى يمكن لنظمها الإنزيمية أن تعمل فى وجود الأكسجين أو فى غيابه بشرط وجود مواد تستعمل كمصدر للأكسجين مثل النيترات مثلاً فهى تكيف نفسها حسب الظروف ومجموعة أخرى غير مكترسة بالأكسجين indifferent فهى التى تنمو بنفس الكفاءة سواء وجد الأكسجين أم لم يوجد وهذه تعرف بالكائنات غير الهوائية اختيارا Facultative anaerobes، ومجموعة رابعة تحتاج الأكسجين بتركيز منخفض جداً وتعرف microaerophilic• وللتعرف على البكتيرات المجهولة يجب أن تعلم إلى أى مجموعة ينتمى الميكروب المجهول•

وهناك عدة طرق لإختبار مدى حاجة الكائنات البكتيرية من الأكسجين وقد تفيد بعض من هذه الطرق أيضاً فى عزل الكائنات غير الهوائية فى مزارع نقية• وفيما يلى وصفاً لطريقتين منها:

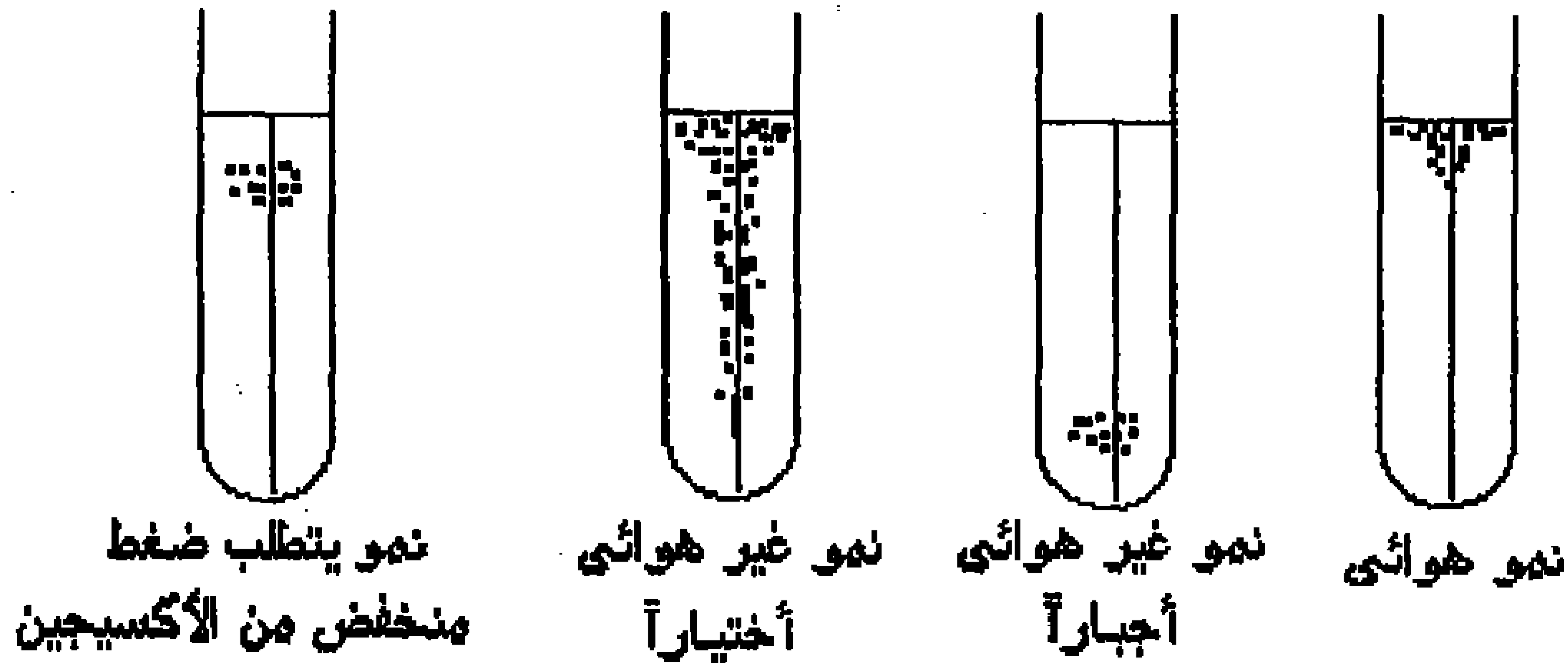
(أ) طريقة الآجار العميق:

التمرين الثانى والثلاثون

١ـ إغمس إبرة تلقيح مستقيمة معقمة فى معلق مائى لتربة زراعية٠

٢ـ أوخز بها بيئة آجار الجلوكوز العميق، سبق إسالتها وتصلبها وذلك لطرد ما قد يكون مختلطاً بها من هواء٠

٣ـ ضع الأنابيب بالحضان (٣٧ْم) لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحص الأنابيب ولاحظ النموَالبكتيرى الناتج على طول خط الوخز مستعيناً بالحالات المبينة بشكل ٣٦ ٠



شكل ٣٦ : الحالات المختلفة لنمو البكتيرات بالآجار العميق٠

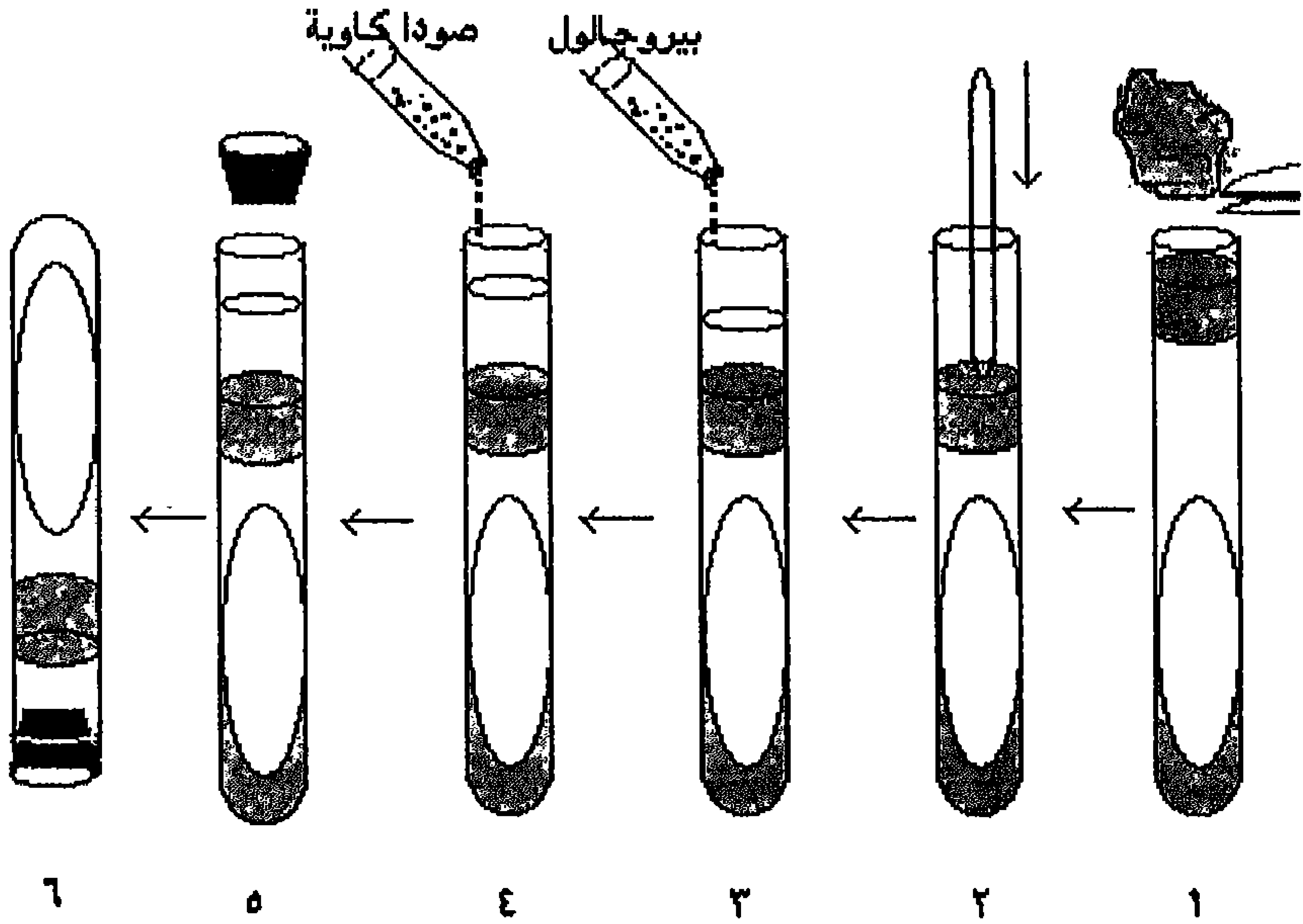
(ب) طريقة أنبوبة رايت Wright tube method

لتنمية بكتيره غير هوائية على آجار مائل فإن الباحث يمكنه توفير جواً خالياً من الأكسجين بداخل الأنبوبة بالإستعانة بتفاعل كيماوى بين البيروجالول والصودا الكاوية٠ والمادة الأولى تعتبر مادة إختزالية قوية تزيل الأكسجين من الأنبوبة ٠

التمرين الثالث والثلاثون

(١) لقح ثلاثة أنابيب آجار جلوكوز مائل واحدة بكل بكتيره من البكتيرات الآتى ذكرها *Clostridium sporogenes , Bac. subtilis , Clostridium rubrum , Control* ، أو بمعلق التربة الزراعية السابق استعماله أو بالنمو غير الهوائى الناتج فى قاع أنبوبة الآجار العميق •

(٢) جهز الأنابيب الأربعة حسب ما هو مبين فى شكل ٣٧ ففى الخطوة ١ يجب أن تقص السدادة القطنية بواسطة مقص وما يتبقى منها بداخل الأنبوبة يدخل بالضغط بظهر إبرة التلقيح داخل الأنبوبة بمساحة ٤/١ بوصة من الآجار المائل الملقح وكذلك الخاص بالمقارنة ١ •



شكل ٣٧: طريقة تحضير أنبوبة رايت .

(٣) يوضع كمية من البيروجالول ثم يضاف إليه كمية من الصودا الكاوية ثم تقفل الأنبوبة بسدادة فلينية أو مطاطية غلقاً جيداً ثم تقلب الأنبوبة بسرعة لمنع تسرب سوائل التفاعل إلى المزرعة٠

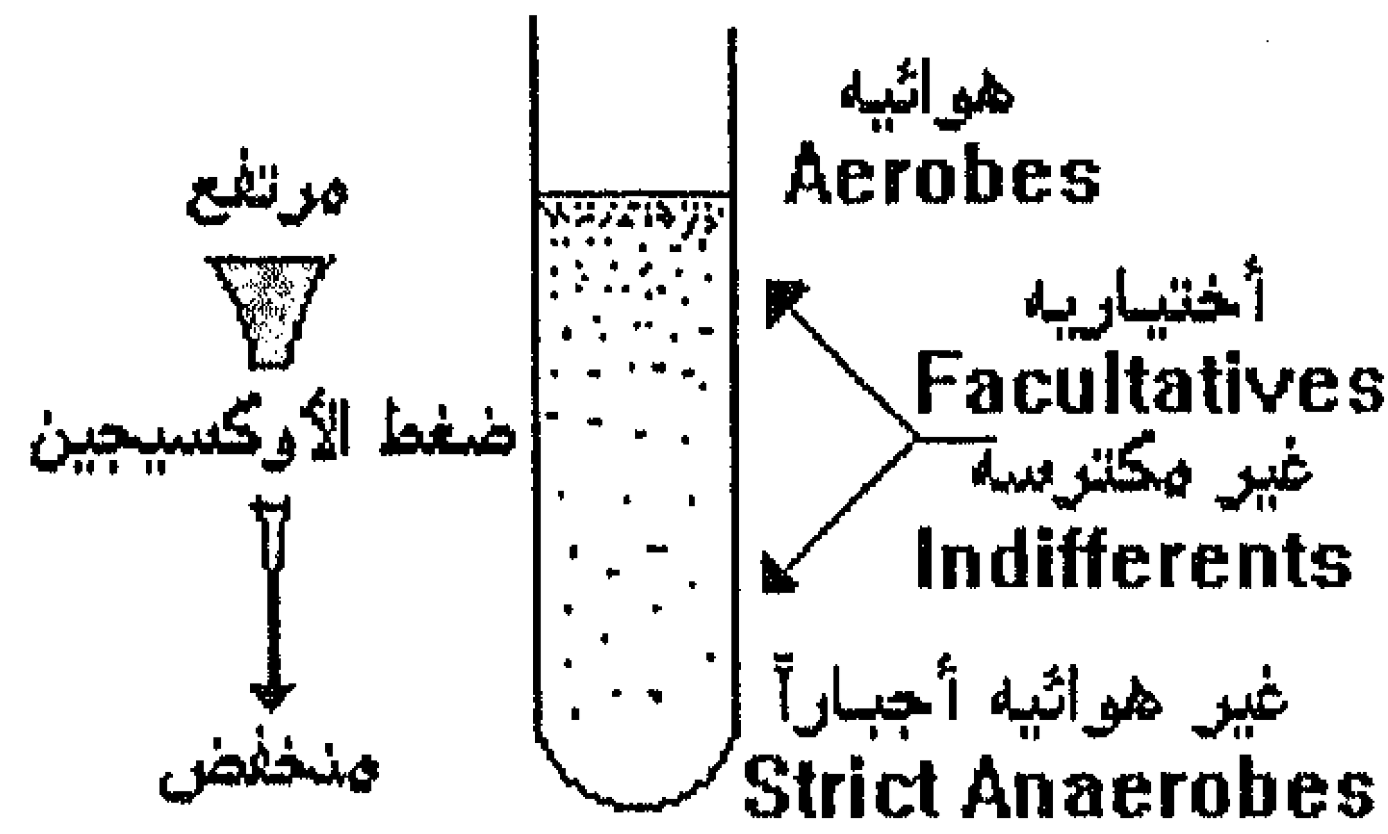
(٤) توضع الأنابيب بالحضان مقلوبة على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ساعة٠

(٥) قارن بين النموات بكل أنبوبة ودون ما تراه.

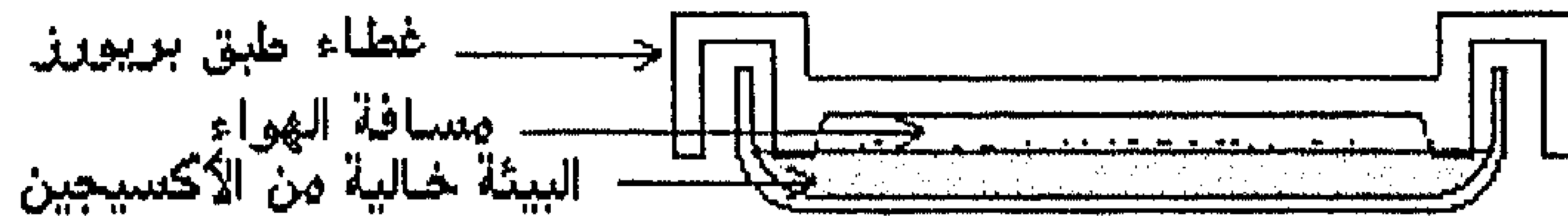
(جـ) طريقة بيئة مرق Thioglycolate

التمرين الرابع والثلاثون

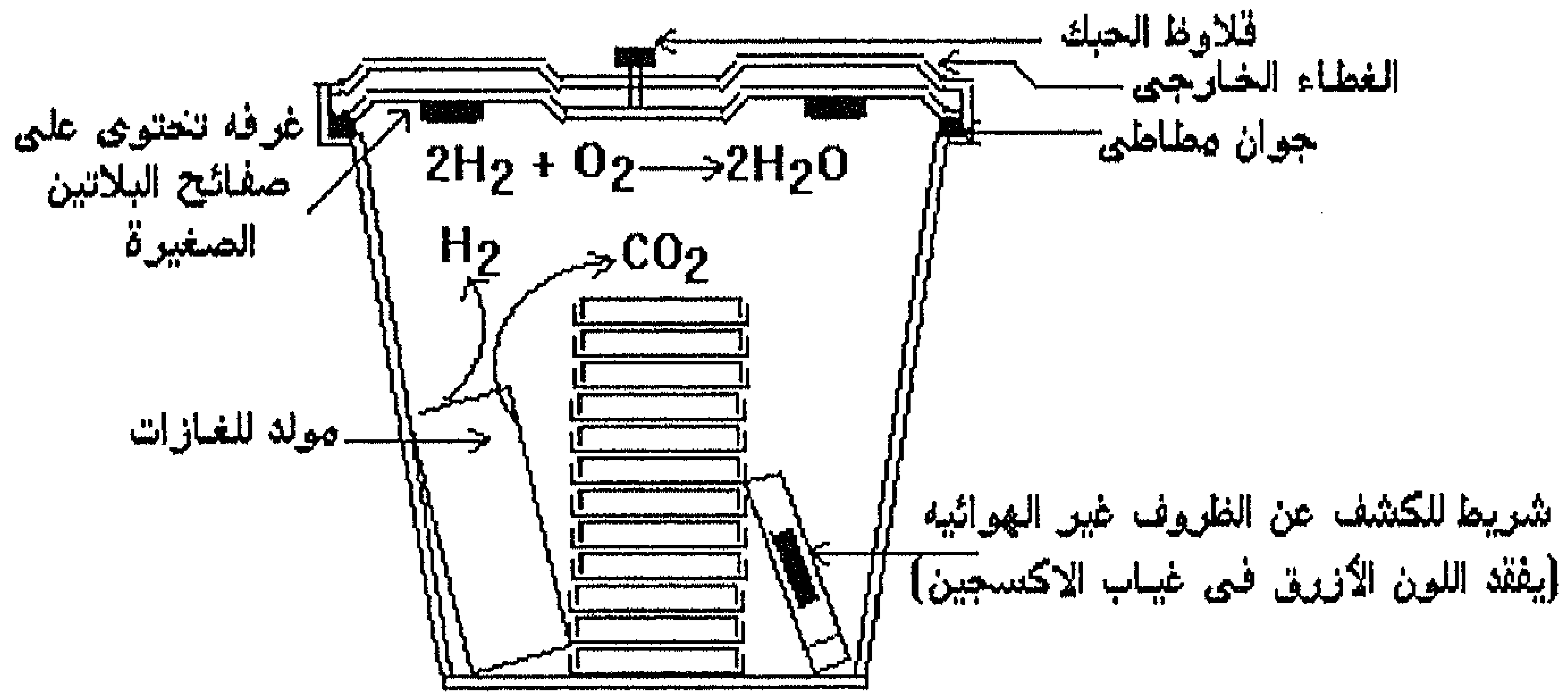
ويستعمل بيئة مرق thioglycolate لتقدير نوعية الميكروب المجهول فيما يختص بحاجته للأكسجين وهذه البيئة تحتوى على جلوكوز ، سيستين ، وثيوجليكولات الصوديوم لتقلل من كفاءتها التأكسدية الإختزالية كما تحتوى على صبغة resazurin لتكشف عن وجود الأكسجين ففى وجوده تتخذ الصبغه اللون الوردى وحيث أن وجودالأكسجين بكثرة بالقرب من سطح البيئة فهى تتخذ اللون الوردى عن سطحها وعديمة اللون فى الوسط وفى القاع ويضاف الآجار إلى البيئة لتثبيت النمو ويزيد من عدم تهوية قاع الأنبوبة(شكل٣٨)٠وهناك طرق أخرى لتنمية البكتيرات غيرالهوائية مبينة بالأشكال التالية شكل ٣٨ أ ، شكل ٣٨ ب ، شكل ٣٨ جـ٠



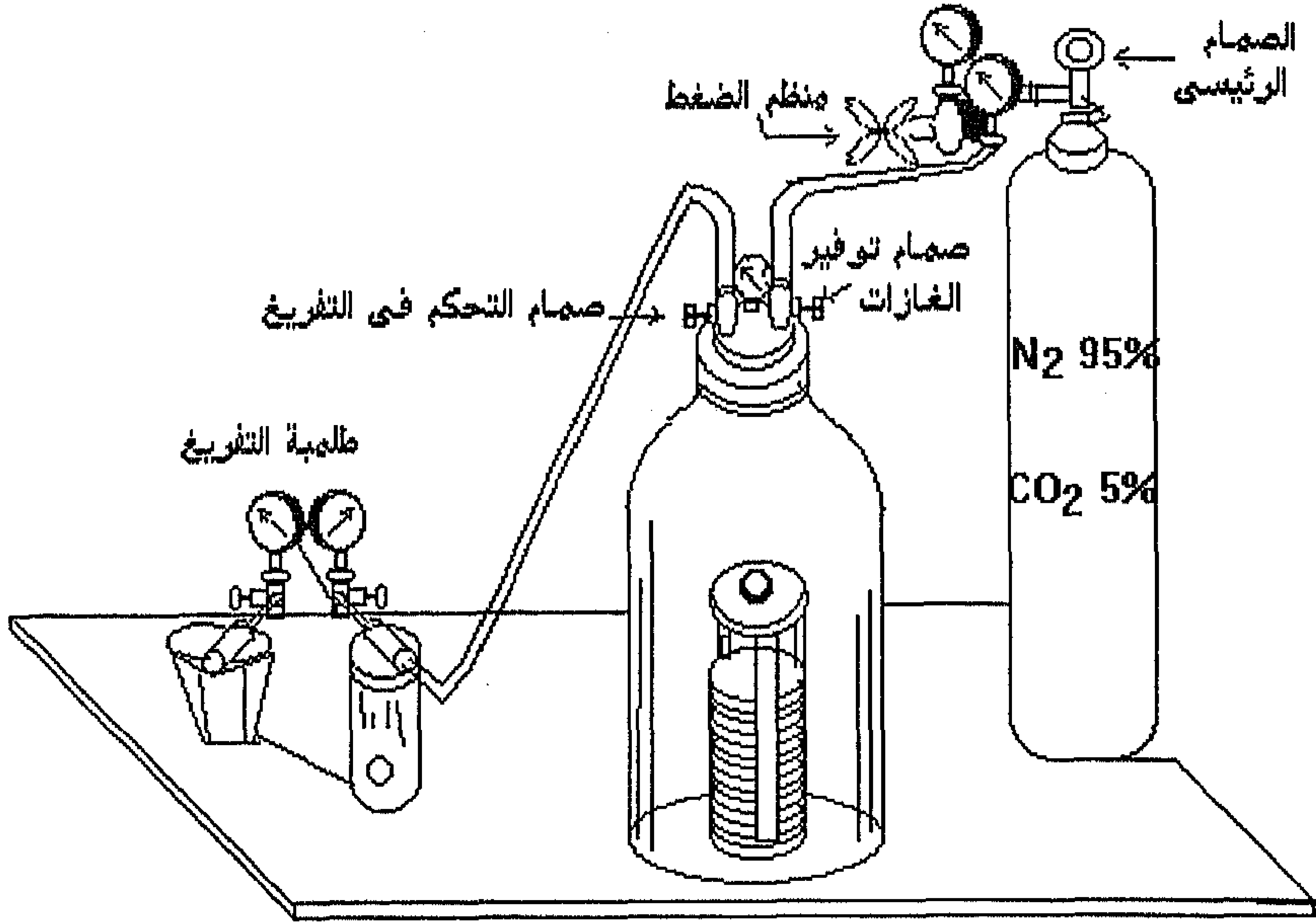
شكل ٣٨ طريقة بيئة ثيوجليكولات



شكل ٣٨ أ : طبق بريورز : المسافه المحصوره تشمل هواء خالى من الاكسجين نتيجه لفعل الثيوجليوكولات المحتوى عليها الآجار.



شكل ٣٨ ب : يبين The Gas Pak system



شكل ٣٨ جـ : أجهزة توفير التفريغ والغازات فى غرفة التنمية٠

٤ـ تأثير الإشعاع:

بعض الإشعاعات مثل الآشعة فوق البنفسجية وآشعة جاما والآشعة الجزيئية (الناتجة عن الإلكترونات موجبة الحركة) وغيرها من الإشعاعات، لها تأثير ضار ومميت للبكتيرات٠ ولعل الآشعة فوق البنفسجية والآشعة السينية هى أكثر الإشعاعات دراسة فى هذا الصدد، فالآشعة فوق البنفسجية مثلاً ليست سامة فقط لخلايا البكتيرات بل انها تعمل أيضاً على تكوين مواد سامة فى بيئات الزرع الملقحة أو غير الملقحة عندما تعرض لها هذه البيئات٠ والتمرين التالى يبين تأثير هذا النوع من الآشعة على مزارع البكتيرات٠ فقد يكون التأثير مميت للخلايا البكتيرية نفسها أونتيجة لفعل الأشعة على بيئة الزرع أو بكلا الطريقين٠

التمرين الخامس والثلاثون

١- لقح أنبوبتين من الآجار المغذى المسال والمبرد على درجة ٤٥°م أحدهما بالبكتيره *E. coli* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٢٤ ساعة) ، والأخرى بالبكتيره *Bacillus subtilis* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٧٢ ساعة) اخلط اللقاح جيداً بالآجار بكل أنبوبة٠

٢- صب محتويات كل من الأنبوبتين فى طبق بترى معقم وأتركها لتتصلب٠

٣- أحضر قطعتين من الورق الأسود وأقطع بها شكلاً معيناً وليكن أول حرف من اسمك٠

٤- أرفع غطاء كل من الطبقين وغطى الطبق بقطعة من الورق الأسود جيداً مع إحكام التغطية برباط من الخيط٠ (يرفع الغطاء لأن الزجاج يمنع مرور الاشعة فوق البنفسجية) ٠

٥- عرض الأطباق لمصباح يشع موجات الآشعة فوق البنفسجية لمدة ٢/١ ساعة٠

٦- بعد مرور الوقت اللازم ارفع الورق الأسود وأعد للأطباق أغطيتها الزجاجيه ثم ضعها بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة٠

٧- قارن عدد المستعمرات فى المناطق المعرضة للضوء وتلك التى لم تعرض ودون نتائجك٠

ملحوظة: لا تنظر مباشرة فى الأشعة فوق البنفسجية لتأثيرها الضار على النظر ويجب أرتداء نظارة تقى العين أو نظارة تقى الوجه بأكمله من تأثير الأشعة الضار٠

ويمكن تعريض بيئة غير ملقحة بعد تغطيتها بقطعة من الورق الأسود ذات الأشكال المعينة ثم تلقح بعد ذلك بالبكتيرات وتحضن للتعرف على تأثير الآشعة على البيئة نفسها فى المناطق المعرضة.

٥ـ تأثير الجفاف The effect of desiccation

لا يمكن للكائنات الحية الدقيقة أن تواصل نموها وتكاثرها تحت ظروف الجفاف الشديدة. وخلايا البكتيرات كما سبق أن ذكرنا شأنها شأن الخلايا النباتية يجب أن تحصل على غذائها فى صورة ذائبة فى الماء إذ يشترط إذن لنموها أن تتوفر لها الرطوبة بدرجة كافية. وعندما تجف البيئة وما تحتويها من الخلايا نفسها على ضغط الجو العادى، فإن ذلك يدعو إلى توقف النمو الذى يعقبه الموت. ومعدل موت الخلايا نتيجة للجفاف قد يتأثر تبعاً لتغير بعض العوامل الأخرى. فمثلاً إذا تم تجفيف الخلية عن طريق تجميدها فى جو مفرغ من الهواء فإن ذلك من شأنه حماية الخلية من الموت، وإذا استمرت ظروف التفريغ هذه لمدة طويلة فإن ذلك يؤدى إلى إحتفاظ بعض الخلايا المعاملة بهذه الطريقة بحيويتها لمدد طويلة جداً.

وتعرف عملية التجفيف والتبريد تحت تفريغ باسم Lyophilization وهى من الطرق الحديثة المعتادة فى حفظ مزارع الكائنات الحية. أما إذا جففت الخلايا دون تجميدها أولاً فإن ذلك يؤدى إلى زيادة تركيز بروتوبلازم الخلايا، وهذا يعرض الخلايا وهى على هذه الحالة إلى عمليات البلزمة التى تؤدى بها إلى الموت السريع نظراً لقلة محتوياتها من الرطوبة.

التمرين السادس والثلاثون

١ـ عقم ثمانية أغطية شرائح نظيفة، وذلك بطريقة التلهيب الكحولى عدة مرات ثم ضع كل أربعة منها فى طبق بترى معقم ٠

٢ـ انقل نقطة صغيرة من مزرعة البكتيره *E. coli* (٢٤ ساعة) إلى مركز أغطية الشرائح فى أحد الأطباق، وأنقل نقطة صغيرة من مزرعة *Bacillus subtilis* (٧٢ساعة) إلى مركز الأغطية فى الطبق الآخر ٠

٣ـ ضع الأطباق فى كل الحضان واترك النقط لتجف بداخل الطبق ٠

٤ـ بواسطة ملقط معقم أنقل غطاء شريحة واحد بعد أن يجف ما عليه إلى طبق بترى معقم ثم صب عليه كمية من بيئة الآجار المغذى بعد إسالتها وتبريدها لدرجة ٥٠°م ثم رج محتويات الطبق جيدا لتوزع به البيئة ٠

٥ـ ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧°م٠

٦ـ أترك باقى الأغطية فى أطباقها بداخل الحضان لمدة ٤٨ ساعة ثم كرر العملية كل ٤٨ ساعة٠

٧ـ قدر عدد المستعمرات التى تظهر على سطح بيئة الآجار ٠

٨ـ دون النتائج المتحصل عليها فى جدول ٠

٦ـ تأثير التوتر السطحى Effect of surface tension

بعض البكتيرات تنمو على البيئات السائلة مكونة غشاء منتظم أو متقطع فوق سطح البيئة ، وتعرف هذه البكتيرات المكونة لنمو غشائى pellicle growth ومن المعروف أن هذه المجموعة من البكتيرات تكون هوائية إجباراً أو هوائية إختياراً٠ والنمو السطحى هذا يكون عادة معتمداً على قوة توتر سطح البيئة فإذا خفضت هذه القوة بأى طريقة من الطرق فإن النمو لا يحدث على صورة غشاء بل يظهر مختلطاً ومنتشراً بالبيئة٠

التمرين السابع والثلاثون

١ـ حضر ثلاث أنابيب تحتوى كل منها على ١٠ مل بيئة مرق مغذى ورقمها بقلم شمع ١،٢،٣ ٠

٢ـ لقح الأنابيب الثلاث بمزرعة آجار مائل بالبكتيره *B. subtilis* بعمر ٢٤ ساعة٠

٣ـ أترك الأنبوبة رقم ا كما هى ثم أضف إلى الأنبوبة رقم٢ كمية٥, ٠ سم^{3}من مادة رسينوليات الصوديوم Sodium ricinoleate أو أى مادة خافضة للتوتر السطحى مثل مادة الترايتون ب Triton B. 1956 بعد تخفيفه بنسبة ١: ١٠٠٠ وللأنبوبة رقم ٣ كمية ١ سم^3 من نفس المادة، رج الأنابيب جيداً٠

٤ـ ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة٠

٥ـ اختبر طبيعة النمو على الأنابيب الثلاث، دون نتائجك وملاحظاتك٠

ثانياً: العوامل الكيماوية

يقصد بالعوامل الكيماوية تلك التى تستند إلى أسس كيماوية وتؤثر على النمو البكتيرى إما بإيقافه بصفة مؤقتة Bacteriostatic أو بصفة دائمة Batericidal ومن أمثلة هذه العوامل التركيزات المختلفة من أيونات المعادن الثقيلة وكذلك الأصباغ وبعض المواد الأيضية السامة التى عندما يزداد تركيزها بالمزرعة يتوقف النمو كلية، وكما سبق أن ذكرنا أن بعض العوامل الفيزيائية والحيوية تحدث فعلها الضار للبكتيرات عن طريق كيماوى كما يحدث عند إفراز بعض الكائنات أثناء نموها مواد كيماوية سامة لغيرها من الكائنات٠

١- تأثير المعادن الثقيلة:

يعرف فعل المعادن الثقيلة على النمو البكتيرى باسم الفعل الألويجوديناميكى Oligodynamic action ، فهناك بعض المعادن الثقيلة التى عندما توجد فى تركيزات منخفضة يكون فعلها ساماً على البكتيرات٠ ولبيان هذا التأثير تجرى خطوات العمل التالية:

التمرين الثامن والثلاثون

١- أسل كمية من بيئة الآجار المغذى فى دورق مخروطى واتركها لتبرد إلى درجة حرارة ٥٠°م٠

٢- لقح البيئة بإضافة ١, ٠ مل من مزرعة البكتيره *E. coli* والنامية لمدة ٢٤ ساعة على بيئة المرق المغذى ورجها جيداً٠

٣- صب البيئة الملقحة فى عدة أطباق بترى معقمة واتركها لتتصلب٠

٤- ضع على سطح الآجار بأحد الأطباق عملة نحاسية أو برونزية ثم ضع بطبق آخر عملة فضية وبطبق ثالث مسمار حديدى٠

٥- أترك الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٢٤ ساعة٠

٦- لاحظ المناطق الخالية من النمو البكتيرى حول العملة والمسمار الحديدى، والتى يطلق عليها المناطق الأليجوديناميكية Oligodynamic zones ٠

٧- لاحظ غزارة النمو البكتيرى على حواف هذه المناطق الخالية من النمو وذلك يرجع إلى أن التركيزات الضئيلة جداً من المعادن الثقيلة والتى تصل إلى حواف المنطقة العديمة النمو لها على العكس فعلاً منشطاً للنمو البكتيرى٠

٨- لاحظ أن البكتيرات تنمو نمواً عادياً فى باقى أجزاء الطبق٠

٢ـ تأثير الصبغات:

للتركيزات المنخفضة من بعض الأصباغ مثل صبغة الكريستال البنفسجى تأثير موقف لنمو البكتيرات الموجبة دون السالبة لتفاعل جرام• إذن فالتأثير الموقف للنمو فى هذه الحالة تأثير إختيارى، وبغض النظر عن بعض الحالات الشاذة فإن هذا التأثير يتلازم باستمرار مع إيجابية البكتيرات لتفاعل جرام• بمعنى آخر فإن البكتيرات الموجبة لتفاعل جرام تكون دائماً حساسة لفعل التركيزات المنخفضة من هذه الصبغة فى حين أن البكتيرات السالبة لجرام تكون مقاومة للفعل الضار لهذه التركيزات•

التمرين التاسع والثلاثون

١ـ حضر محلول بتركيز ١: ١٠٠ من صبغة الكريستال البنفسجى فى ماء مقطر•

٢ـ أضف ١ مل من المحلول السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى أنبوبة فيصبح تركيز الصبغة١: ١٠٠٠ •بنفس الماصة انقل ٠,١ مل من هذا التخفيف إلى طبق بترى معقم ونظيف•

٣ـ انقل ٠,١ مل من محلول الصبغة بالتركيز السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١: ١٠,٠٠٠ ثم انقل بنفس الماصة ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم•

٤ـ انقل ١ مل من محلول الصبغة بالتركيز الأخير إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١: ١٠٠,٠٠٠ • انقل بنفس الماصة ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم ونظيف•

٥ـ أسل بيئة الآجار المغذى فى أربعة أنابيب (كل أنبوبة ٩ مل) وأفرغ محتويات أنبوبة واحدة بكل طبق ثم حرك الطبق إلى الأمام والخلف حتى يتم

خلط البيئة بالصبغة. لاحظ أن تركيز الصبغة فى كل طبق سوف يصبح ١/١٠ التركيز المضاف.

٦ـ صب بيئة آجار مغذى فى طبق خالى من الصبغة.

٧ـ بعد تصلب البيئة فى كل الأطباق أقلبها وبواسطة قلم شمع ، قسم الطبق إلى قسمين وأكتب على كل قسم أسم البكتيره المستعملة فى تلقيحه.

٨ـ لقح أحد قسمى الطبق بمزرعة حديثة(٢٤ساعة) من البكتيرة *E.coli*، والقسم الآخر بمزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* كرر عمليات التلقيح هذه بكل الأطباق المستعملة.

٩ـ ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة.

١٠ـ دون النتائج بجدول واضح واضعاً علامة(+) أمام كل تركيز لتشير إلى وجود نمو، وعلامة (-) إلى غيابه. استنتج ما يمكن أن تتيحه هذه النتائج.

ثالثاً العوامل الحيوية

توجد البكتيرات عادة فى بيئاتها الطبيعية مختلطة مع غيرهامن الكائنات الحية الدقيقة ، ولاشك أن لهذه المعيشة المختلطة تأثيراً واضحاً على نمو وتأقلم البكتيرات فى هذه البيئات. وتوجد علاقات مختلفة بين الكائنات الحية الدقيقة وبعضها فى المعيشة المختلطة، فقد تنشأ فيها علاقات تضادية Antagonism أو Antibiosis ، أو معيشة تكافلية (تبادل منفعة) Symbiosis ، أو معيشة منفعة من طرف واحد حيث أن الطرف الآخر لا ينتفع أو يضار من هذه المعيشة والتى يطلق عليها التعايش الإيجابى من جانب واحد Commensalism أو أن تلازم الكائنات مع بعضها يمكنه إحداث تغييرات فى البيئة لا يمكن لإحداها أن تحدثها بمفردها وتعرف هذه الظاهرة بالتعايش الإيجابى المشترك Synergism .

التضاد: Antibiosis or antagonism

للكائن الدقيق طرقاً مختلفة للمحافظة على بقائه، فهو إما أن يخرج مواد أيضية تغير من ظروف البيئة مثل تلك التى تزيد من حموضته ، أو تغير من الضغط الأسموزى أو التوتر السطحى للبيئة جاعلة إياها غير مناسبة لنمو الكائنات الأقل تحملاً لهذه الظروف غير الطبيعية، وقد يمكن للكائن الحى أن يفرز مادة سامة يمكنها أن تتدخل بطريقة ما فى طرق التحول الأيضى للكائنات الأخرى بدرجة قد تمنع من نموها أو تؤدى بها إلى الموت، والطريقة الأخيرة من التضاد هى التى يطلق عليها اسم التضاد الحيوى Antibiosis ، إذن يمكن تعريف ظاهرة التضاد الحيوى بأنها معيشة كائنين معاً يعمل أحدهما على إحداث ضرر واضح بالكائن الآخر نتيجة لإفرازه مادة كيماوية ، والمواد الكيماوية السامة التى تفرز تعرف باسم المضادات الحيوية Antibiotics،

أولاً: التضاد الطبيعى

هو الذى يتم فى وجود نمو نشط للكائن المضاد، ولدراسة هذا النوع من التضاد يتبع جملة طرق نذكر منها الطريقتين التاليتين:

الطريقة الأولى:

التمرين الأربعون

١ـ أسل بيئة آجار مغذى فى أنابيب ثم أتركها لتبرد لدرجة ٥٠°م ،

٢ـ لقح أنبوبتين منهما بإضافة ١, ٠ مل من مزرعة *Sarcina sp.* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة،

٣ـ لقح الأنبوبتين الأخرتين بإضافة ١, ٠ مل من مزرعة *E. coli* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة،

٤ـ صب كل من الأنابيب الأربعة بعد التلقيح فى طبق بترى معقم وأترك البيئة الملقحة لتتصلب وأكتب اسم البكتيره الملقحة على كل طبق ٠

٥ـ خطط سطح الآجار بطبق واحد من الطبقين الملقحين بواحد من البكتيرتين المذكورتين بلقاح من مزرعة البكتيره *Bacillus subtilis* نامية على بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة٠

٦ـ أترك الطبقين الآخرين دون إعادة تلقيحها بالبكتيره *Bacillus subtilis*

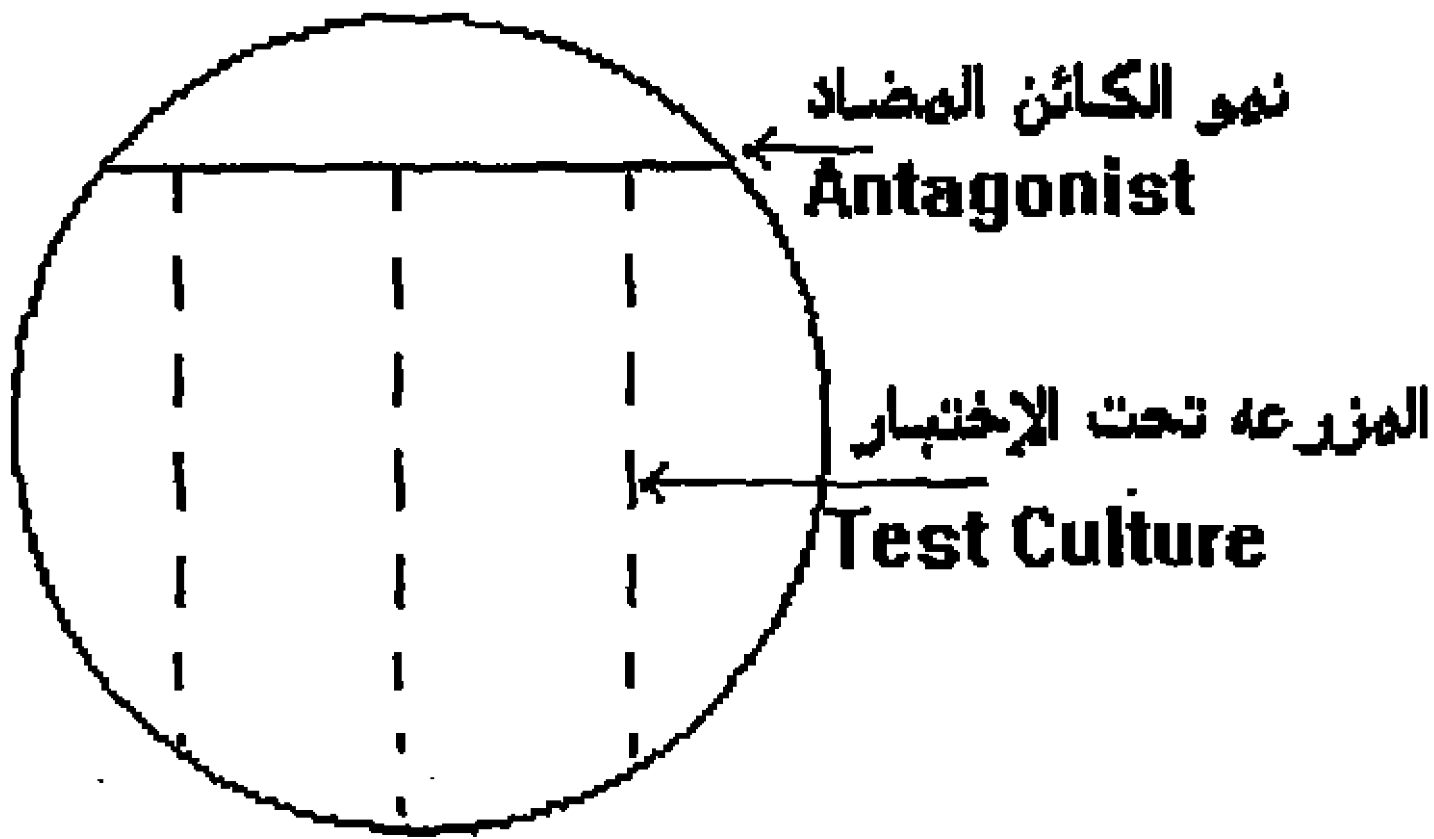
٧ـ ضع الأطباق مقلوبة بالحضان (٣٠م) لمدة ٤٨ ساعة ثم إفحصها باحثاً عن مناطق خالية من النمو البكتيرى حول خطوط نمو البكتيره *Bacillus subtilis* ودون نتائجك فى جدول ٠

الطريقة الثانية:

التمرين الحادى والأربعون

١ـ صب بيئة دكستروز آجار البطاطس ، (أنظر ملحق البيئات)، أو بيئة الآجار المغذى فى ٤ أطباق وأتركها لتتصلب٠

٢ـ أغمس إبرة تلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها فى مزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* ٠ ثم خطط سطح الآجار فى طبقين وذلك بعمل خطاً مستعرضاً بكل طبق يبعد حوالى بوصة عن حافة الطبق (شكل ٣٩) ٠



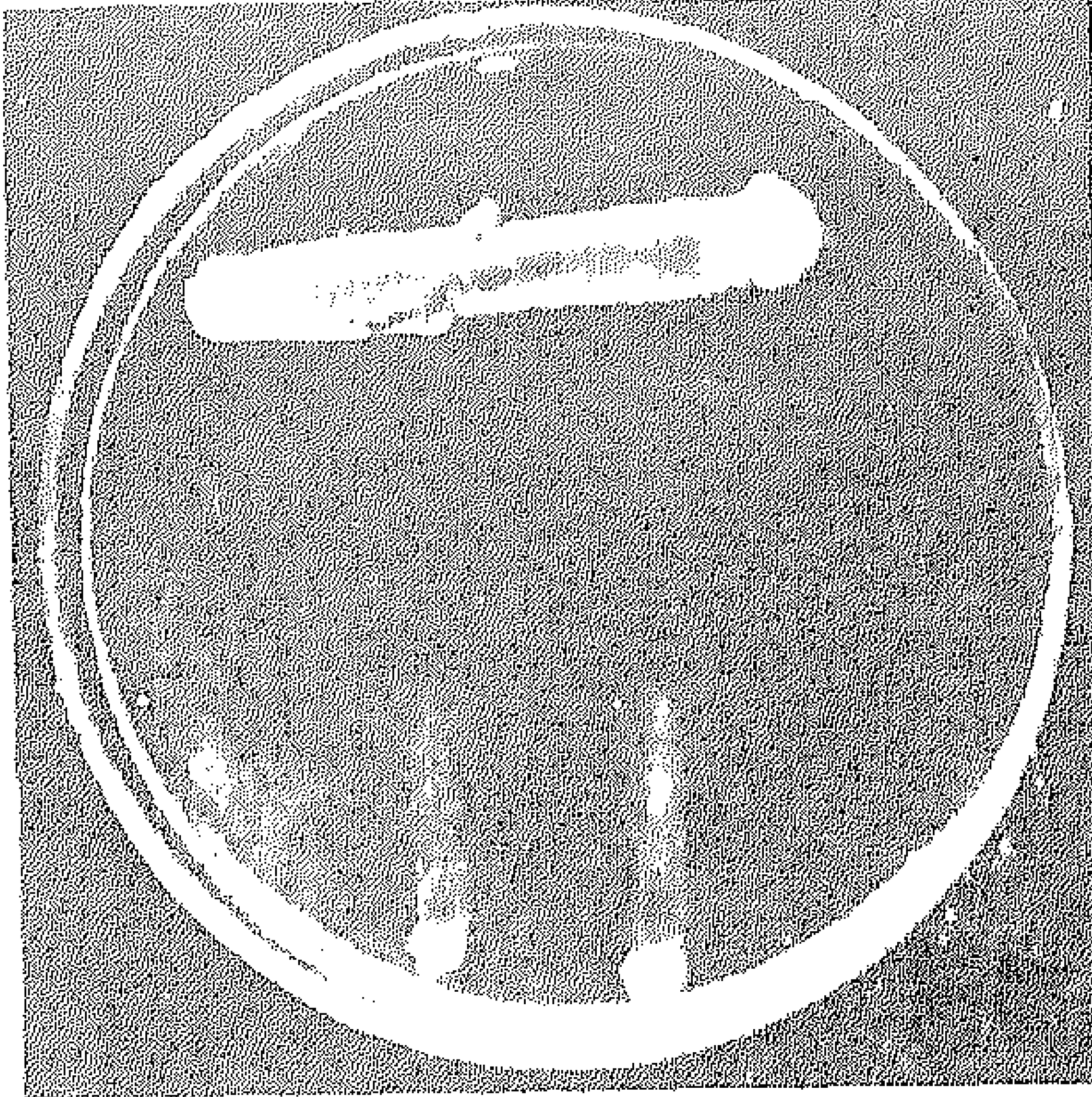
شكل ٣٩: إحدى طرق دراسة التضاد الطبيعى ٠

٣ـ كرر ما سبق ولكن باستعمال معلق من جراثيم الفطر *Penicillium patulum* يخطط به سطح الآجار قرب حافة طبقين آخرين٠

٤ـ ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ ساعة ،

٥ـ بعد إنتهاء فترة التحضين خطط سطح الآجار بشكل خطوط متعامدة على النمو البكتيري أو الفطرى الناتج بعد التحضين وذلك بإبرة تلقيح سبق غمسها في مزرعة من النوع البكتيرى تحت الإختبار Test culture ويستعمل لذلك مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من *E. coli* و أخرى من *Pseudomonas solanacearum* (مزرعة بكل طبق) ،

٦ـ ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) مرة أخرى لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحصها ملاحظاً وجود مناطق خالية من النمو على طول خطوط تلقيح الكائن المختبر مستعيناً بشكل ٤٠ ،



شكل ٤٠: التضاد الطبيعى الذى يحدثه الفطر *Penicillium patulum* لنمو البكتيره *Pseudomonas solanacearum* (لاحظ القوة التضادية للفطر من درجة اتساع المنطقة الخالية من النمو البكتيرى) ،

ثانياً: دراسة تأثير التحضيرات التجارية من المضادات الحيوية:

يوجد بالأسواق عدد كبير من المضادات الحيوية Antibiotics يمكن التعرف على تأثيرها فى منع نمو الكائنات البكتيرية دون الحاجة إلى إستعمال الكائن المضاد الذى يفرز هذه المضادات الحيوية، ولمثل هذه الدراسات عدة طرق نذكر منها الطريقة التالية:

طريقة أقراص ورق الترشيح:

التمرين الثانى والأربعون

١ـ حضر محاليل ذات تركيز ٢٠٠ ميكروجرام / ١مل من المضادات الحيوية الآتية :بنسلين Penicillin ، ستربتومايسين Streptomycin، أو أوكسى تتراسيكلين Oxytetracvcline ٠

٢ـ جهز أقراص من ورق ترشيح ماص بقطر ٧ مم ثم ضعها فى طبق بترى نظيف ثم عقمها فى الأوتوكلاف٠

٣ـ أسل ثلاث أنابيب آجار عميق (١٥ مل بيئة آجار مغذى) ثم أتركها لتبرد (٥٠°م) ٠

٤ـ لقح أحد الأنابيب بإضافة ١, مل من مزرعة حديثة من البكتيره *E. coli* والأنبوبة الثانية بكمية متساوية من مزرعة حديثة من البكتيره *Bacillus subtilis* والأنبوبة الثالثة بمزرعة من البكتيره *Staphylococcus aureus* ٠

٥ـ صب الأنابيب الثلاث بعد التلقيح فى ثلاثة أطباق بترى معقمة وأتركها لتتصلب وأكتب اسم البكتيره الملقحة بكل طبق٠

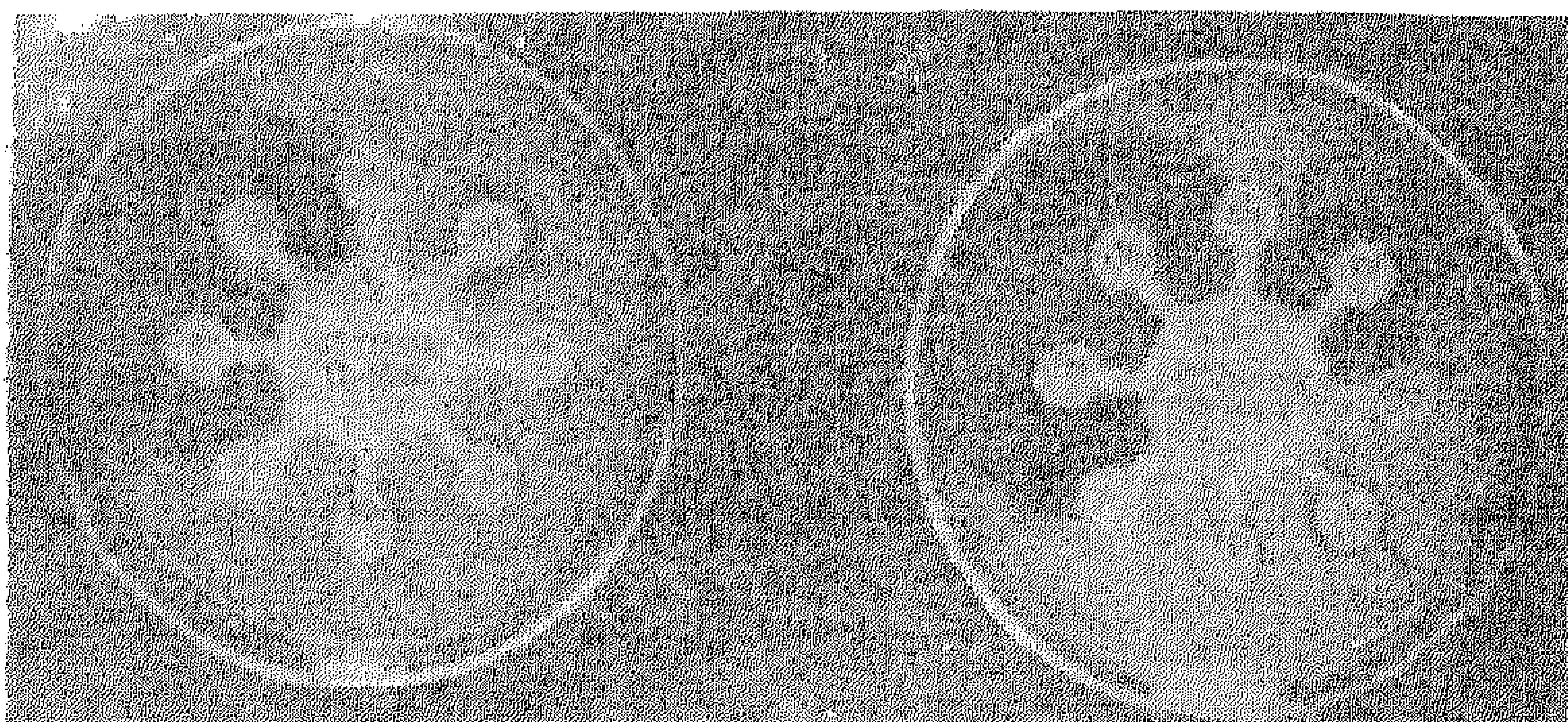
٦ـ إقلب الطبق وقسم قاعه بواسطة قلم شمع إلى ثلاثة أقسام متساوية وأكتب على كل قسم اسم أحد المضادات الحيوية بالقلم الشمع٠

٧ـ أضف ٠٥, مل من المضاد الحيوى بواسطة ماصة دقيقة معقمة إلى أحد أقراص ورق الترشيح ثم ضعه بواسطة ملقط معقم فى وسط القسم المخصص له مع الضغط البسيط على القرص حتى يلتصق بسطح الآجار٠ كرر ذلك باستعمال قرص لكل مضاد حيوى٠ (يلاحظ أن كمية المضاد الحيوى تكون فى هذه الحالة ١٠ ميكروجرام لكل قرص من كل مضاد حيوى) ٠

٨ـ حضن الأطباق فى حضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة ثم إفحصها للتأكد من وجود منطقة خالية من النمو البكتيرى حول القرص٠ قدر

قطر المنطقة الخالية من النمو التى تتناسب كمياً مع حساسية البكتيره المعينة لمضاد حيوى معين، سجل النتائج فى جدول،

ملحوظة: يوجد بالأسواق أقراص مجهزة من ورق ترشيح تحمل كميات معلومة من المضاد الحيوى، وقد يكون كل قرص منفرداً Unidisk أو قد تكون عبارة عن قرص مكون من عدد من الأقراص الصغيرة متصلة ببعضها مركزياً (شكل ٤١) يحتوى كل قرص منها على مضاد حيوى مختلف بتركيز معين، وتعرف مجموعة الأقراص بالقرص المتعدد Multidisk ويلاحظ أن استعمال هذه الأقراص يسهل كثيراً من إجراء الإختبار،



شكل ٤١: تأثير المضادات الحيوية على نمو سلالتين من البكتيره
Agrobacterium tumefaciens باستعمال طريقة القرص
المتعدد Multidisk method
(لاحظ أن كل قرص صغير يحتوى على مضاد حيوى مختلف عن الآخر)،

الإختبارات البيوكيمائية (الفسيولوجية)

إن من أهم الدراسات التى تجرى على الكائنات البكتيرية بهدف التعرف عليها هى دراسة الصفات الفسيولوجية أو البيوكيمائية التى تظهر نتيجة لفعل

العديد من الإنزيمات البكتيرية • وعادة تختلف البكتيرات فى مدى إحتوائها على هذه الإنزيمات وهذا يؤدى إلى الإختلافات التى نشاهدها من نتائج الإختبارات البيوكيمائية • والبعض يمتلك إنزيمات تحلل النشا أو الجيلاتين فى حين أن البعض الاخر لا يمتلك هذا النوع أو غيره من الإنزيمات•

إختبار إنزيمات التحلل المائى Hydrolyses :

تختلف البكتيرات كما سبق أن بينا فى قدرتها على تحليل المواد العضوية ذات الجزيئات الكبيرة الحجم مثل النشا والسليلوز والجيلاتين والكازين• ويتم تحلل هذه المواد فى وجود الماء أى يكون التحلل مائياً Hydrolysis بغرض تحويلها إلى مواد ذات جزيئات أقل حجماً يسهل على الخلايا امتصاصها•

أ- تحلل النشا مائياً Starch hydrolysis

حيث أن العديد من البكتيرات لها القدرة على تحليل النشا مائياً، لذلك فكان لهذا الإختبار أهمية كبرى للتعرف على الأنواع البكتيرية المختلفة• وجزىء النشا كبير يتكون من مكونين أساسيين:-

احدهما الأميلوز ويتكون من٢٠٠-٣٠٠ وحدة من سكر الجلوكوز مرتبطة فى سلسلة مستقيمة بعضها ببعض بالرابطة الجلوكوسيدية ١، ٤ وثانيهما مركب الأميلوبكتين وهو سلسلة طويلة ومتفرعة من وحدات من سكر الجلوكوز ومجاميع فوسفورية مرتبطة ببعضها بالروابط سالفة الذكر ولكن عند مواضع التفرع يكون الإتصال بروابط جلوكوسيدية١، ٦ •

والبكتيرات التى تملك القدرة على تحليل النشا تفرز أربعة أنواع من الإنزيمات:

١- ألفا أميلاز α amylase ويعرف أيضاً بالأميلاز الداخلى Endoamylase والإنزيم يحلل الروابط الجلوكوسيدية ١، ٤ الداخلية فى السلاسل

الطويلة فتتكسر إلى وحدات لا زالت كبيرة الحجم وذلك فى الأميلاز أما فى حالة الأميلوبكتين ففعلها يتوقف عند روابط التفرع ٠

٢ـ بيتا أميلاز β amylase وتعرف أيضاً بالأميلاز الخارجى Exoamylase فهى تحلل أيضاً الروابط الجلوكوسيدية ١، ٤ الخارجية (أى فى أطراف السلاسل) وتزيل وحدات من المالتوز من الأطراف غير المختزلة٠

٣ـ وعلاوة على هذين النوعين من الإنزيمات يوجد إنزيم يعرف باسم أميلو ١ـ٦ جلوكوسيداز يحلل الروابط الجلوكوسيدية ١، ٦ الموجودة فى أماكن تفرع الأميلوبكتين٠

٤ـ إنزيم المالتيز Maltase والذى يحلل وحدات سكر المالتوز الناتجة إلى وحدات من سكر الجلوكوز والذى يهاجم فيما بعد بإنزيمات التنفس أو التخمر داخل الخلايا٠ولأختبار قدرة الأنواع البكتيرية على تحليل النشا أتبع الخطوات التالية :

التمرين الثالث والأربعون

١- أسل بيئة آجار مغذى معقمة ومحتوية على نشا قابل للذوبان بنسبة ٢٪ ثم صبها فى ثلاثة أطباق بترى واتركها لتتصلب .

٢- لقح عن طريق التخطيط سطح الآجار فى أحد الأطباق بمزرعة بكتيريه معلومة وليكن *E.coli* والطبق الثانى بمزرعة معلومة أيضا ولتكن *Bacillus subtilis* واترك الطبق الثالث دون تلقيح .

٣- ضع الأطباق بالحضان لمدة ٤٨ساعة على درجة ٣٧°م .

٤- بعد أنقضاء مدة الحضانة أغمر سطح البيئة بمحلول لوجول اليود Lugol's iodene solution .

٥- أفحص الأطباق ولاحظ المناطق عديمة اللون حول خطوط النمو واللون الأزرق بعيداًعن خطوط التلقيح وهذا يدل على تحلل النشا حول النمو البكتيرى - أما إذا لم توجد مناطق عديمة اللون حول النمو فهذا يعنى عدم قدرة البكتيره على تحليل النشا (شكل ٤٢) .

ب- تحلل السليولوز

السليلوزمن عديدات التسكر يتكون أيضاً من سلاسل طويلة من بيتا- جلوكوز ترتبط بعضها ببعض بروابط (جلوكوسيدية ١-٤) وله وزن جزيئى مرتفع قد يصل إلى٣٠٠٠٠٠ أو أكثر ويوجد بالجدر الخلوية الثنائية و يكون متناسقاً فى بعض المناطق من الجدار ويعرف بالسليلوز المتبلور Crystaline cellulose أوغير متناسقاً ويعرف بالسليلوز غيرالمنظم Amorphus cellulose .

وبعض البكتيرات تحلل السليلوز إما تحت ظروف هوائية أو غير هوائية - وينتج عن عملية التحلل وحدات من سكر الجلوكوز وهذه العملية لها أهمية كبرى فى الطبيعة حيث تقوم البكتيرات بالتخلص من بقايا النباتات بالتربة عن هذا الطريق - كما أنها وغيرها من الكائنات الدقيقة التى تعيش فى كرش الحيوانات المجترة تعمل على تحليل وهضم السليلوز الذى تتغذى عليه هذه الحيوانات المنتجة للحم واللبن .وهناك نظريتان لتحلل السليولوز :-

١ - **نظرية الانزيمين** ويعمل بها أنزيم السليولاز cellulas الذى ينتج عنه مركب السيلوبيوز cellabiose الأقل تعقيدا - ثم أنزيم السلوبابيز cellobiase الذى ينتج عنه وحدات من سكر الجلوكوز .

٢- نظرية الانزيمات المتعددة

ويعمل فيها مجموعة من الأنزيمات أولها أنزيم يطلق عليه C1 الذى ينتج عنه مركب خالى من الماء Polyanhydro glucose ثم مجموعة من أنزيمات Cx (أ-ب-جـ) ينتج عنها وحدات من السلوبايوز cellobiose والجلوكوز. والمادة الأولى تتحلل بواسطة إنزيم السلوبابيز cellobiase إلى جلوكوز أيضاً .وفيما يلى خطوات دراسة تحلل السليولوز هوائياً٠

التمرين الرابع والأربعون

١- حضر ثلاث أنابيب محتوية على ٥مل من بيئة ديبوس Dubos meduem.

٢- أضف لكل أنبوبة ١, ٠ جم سماد بلدى ثم أغمر فيها شريط من ورق الترشيح نظيف بعمق البيئة على أن يبرز منها ١/٢ سم بالقمة .

٣- عقم أنبوبة واحدة من الثلاث أنابيب .

٤- أحفظ الأنابيب الثلاث فى حضان على درجة ٣٠°م لمدة ٧-١٤ يوماً .

٥- أفحص الأنابيب . نلاحظ تآكل ورقة الترشيح إلى سطح البيئة .

٦- حضر غشاء من كل أنبوبة وأصبغه بصبغة جرام وأخرى بالصبغ السالب للتعرف على شكل الكائنات المحللة للسليولوز هوائياً .

خطوات تحلل السليولوز تحت ظروف غير هوائية :

التمرين الخامس والأربعون

كرر ما سبق تحت رقم ١،٢ من التمرين السابق

٣- غطى سطح البيئة بمزيج فاسبار Vaspar mixture بعد إسالته لتوفير ظروف غير هوائية نسبياً فى حالة غياب المزيج المذكور يمكن أضافة ٢ مل من زيت البرافين .

٤- عقم أنبوبه من الثلاث أنابيب بالأوتوكلاف .

٥- أحفظ الأنابيب بالحضان لمدة ١٥ يوماً على درجة ٣٠°م .

٦- لاحظ حدوث نمو وتحلل لورقة الترشيح تحت مزيج فاسبار أو زيت البرافين فى الأنابيب غير المعقمة .

جـ- تحلل الجيلاتين

الجيلاتين عبارة عن بروتين حيوانى يمكن لبعض البكتيرات أن تحلله لأمتلاكها أنزيم خارجى هو أنزيم الجيلاتيناز Gelatinase وعادة يتوقف إفراز هذا الانزيم فى البكتيرات المفرزة له إذا ما نميت فى بيئات محتوية على الكربوهيدرات طبقاً للظاهرة المعروفة بفعل الكربوهيدرات الموفر للبروتينات Protein sparing action لذلك عند أجراء أختبار تحلل الجيلاتين يشترط خلو البيئة من الكربوهيدرات . وأختبار أسالة الجيلاتين فى الجيلاتين العميق بالأنابيب (راجع الصفات المزرعية صفحة ٤٧) فى الأختبارات الهامة فى أعراض التقسيم والتصنيف هذا ويجب أن نلاحظ أن قدرة البكتيرات على تحليل الجيلاتين لا تعنى بالضرورة أن لها قدرة على تحليل البروتينات الأخرى ولأجراء الأختبار يجرى الآتى :

التمرين السادس والأربعون

١- لقح سطح بيئة آجار مغذى محتوية على ١٪ جيلاتين فى طبقى بترى بكل من مزرعة من *E. coli* وأخرى من *Bacillus subtilis* .

٢- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٢٠°م لمدة ٩٦ ساعة .

٣- أخرج الأطباق ثم أغمر سطحها بمحلول من ٥٪ سلفات الألمنيوم أو محلول ١٥٪ كلوريد زئبق محمض أو بأحد الأحماض المخففة واتركه لبضع دقائق ثم تخلص من المحلول .

٤- أفحص سطح الطبق بالقرب من خطوط النمو لاحظ ظهور منطقة رائقة حول هذه الخطوط فى حالة البكتيرات المفرزة للجيلاتيناز نظراً لتحلل الجيلاتين فى هذه المناطق كما نلاحظ تكون راسب أبيض بالآجار بعيداً عن خطوط النمو نظراً لترسب الجيلاتين غير المحلل فى هذه المناطق ـ كما يظهر أيضاً هذا الراسب الأبيض حول خطوط تلقيح البكتيرات غير القادرة على تحليل الجيلاتين .

د- تحلل الكازين Casein hydrolysis

الكازين هو البروتين السائد فى اللبن ووجوده يعطى اللبن لونه الأبيض المميز – وكثير من البكتيرات تفرز أنزيماً خارجياً هو أنزيم Caseinase والذى يحلل الكازين إلى خليط من المواد الذائبة الشفافة ويعرف بعملية تحلل الكازين أيضاً بأسماء آخرى مثل Proteolysis أو Peptonization وفيما يلى خطوات إجراء الأختبار :

التمرين السابع والأربعون

١- أسل ثلاث أنابيب آجار مغذى ثم أتركها لتبرد إلى درجة ٤٥°م .

٢- ضع ١مل من اللبن الفرز (خالى من الدهن) ومعقم فى كل أنبوبة من الثلاث أنابيب .

٣- صب أنبوبة بكل من ثلاثة أطباق بترى معقمة ثم حرك الأطباق لتوزيع اللبن بالبيئة جيداً ثم أترك الآجار ليتصلب .

٤- لقح سطح الآجار بالأطباق عن طريق التخطيط بلقاح من مزرعة حديثة من *E.coli* وبالطبق الثانى لقاح من مزرعة حديثة من *Bacillus subtilis* والطبق الثالث بمزرعة حديثة من *Streptococcus lactis* .

٥- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعه ثم أفحصها لاحظ وجود مناطق رائقة بجوار نمو البكتيرى من عدمه ودون النتائج - وفى حالة وجودها يدل ذلك على تحلل الكازين (شكل ٤٣) .

هـ- تحلل الدهون

إن قدرة الكائن البكتيرى على تحليل الدهون يرجع إلى إفراز إنزيم Lipase وهذا الأنزيم يقسم جزئ الدهن إلى جزئ جلسرول وثلاثة جزيئات من ثلاثة أحماض دهنية ـ ونـاتج هذا التحلل تستخدمه الخلية البكتيرية فى تخليق الدهون البكتيرية وغيرها من المواد اللازمة للخلية ـ وفى بعض الأحيان تحت الظروف الهوائيه يحدث للجلسرول والأحماض الدهنية الناتجة من التحلل عملية أكسدة يكون نتيجتها الحصول على الطاقة - وقدرة البكتيرات على تحليل الدهون يعتبر من الأمور الهامة فى تزنيخ الأطعمة المحتوية على دهون Rancidity وفيما يلى خطوات أجراء الأختبار :

التمرين الثامن والأربعون

١- أسل ٥٠ مل من بيئة الآجار المغذى بدورق مخروطى ثم أضف إليها ١مل من زيت بذرة القطن المعقم ثم أمزج الزيت بالبيئة جيداً .

٢- صب البيئة فى عدد من أطباق بترى معقمة واتركها لتتصلب .

٣- لقح سطح الآجار بأحد الأطباق عن طريق التخطيط بمزرعة حديثة من *E.coli* وطبق آخر بمزرعة حديثة من *Bacillus subtilis* وطبق ثالث بالبكتيرة *Pseudomonas marginata* .

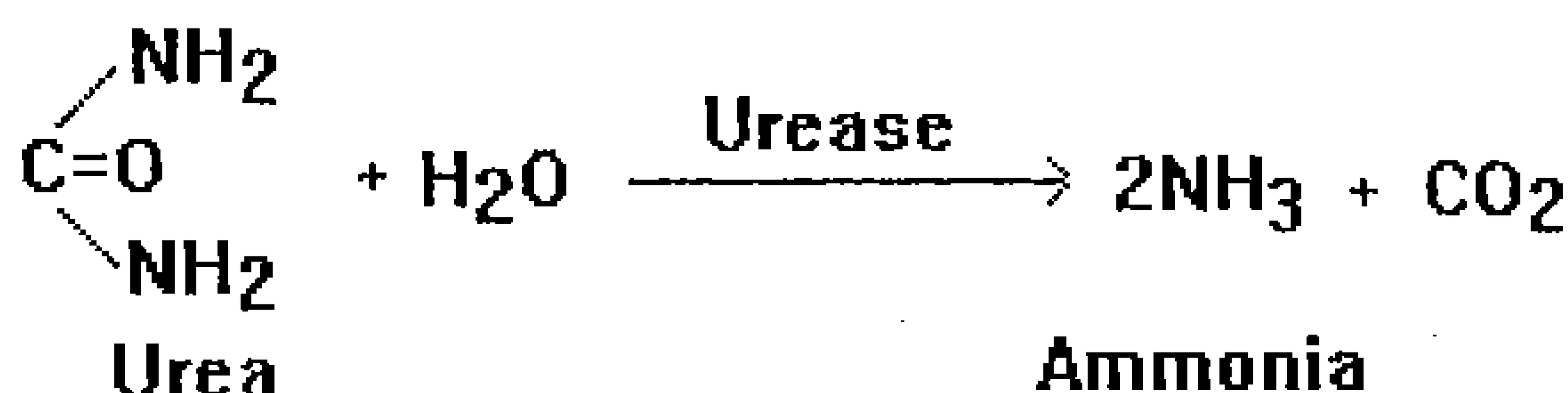
٤- ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٩٦ ساعه .

٥- أغمر سطح الأطباق بكمية كافية من محلول ١٠٪ كبريتات نحاس واتركها لمدة ١٠ دقائق ثم تخلص بعدها من المحلول . أترك الأطباق لمدة ٥ دقائق أخرى ثم أفحصها .

٦- وجود لون أخضر على طول خطوط النمو يدل على تحلل الزيت يستحسن تعريض الأطباق لضوء صناعى أثناء الفحص .

و- تحلل اليوريا

إن إجراء أختبار تحلل اليوريا هام جدا فى التعرف على البكتيرات التى تعيش أو تصيب أمعاء الأنسان فهى تعمل على التفرقة بين مجموعة Proteus من البكتيرات الممرضة السالبة لجرام . ومن أهم مميزات أفراد جنس Proteus هو تحليل اليوريا وإفراز أنزيم Urease والذى يفصل الأمونيا من جزئ اليوريا. وهذه القدرة غير موجودة فى الكائنات الممرضة السالبة لجرام التى يمكن أن تتشابه فى صفات آخرى مع أفراد جنس Proteus .



ومرق اليوريا Urea broth هو عباره عن محلول منظم Buffered solution من مستخلص الخميرة واليوريا . ويحتوى أيضاًعلى دليل الفينول الأحمر Phenol red وحيث أن اليوريا غير ثابتة وتتحلل بسرعة عند التعقيم بالأوتوكلاف لذلك يجب تعقيم مرق اليوريا بالترشيح - ويعبئ فى أنابيب بكميات صغيرة ليسرع من رؤية نتائج التفاعل .

وعندما يفرز أنزيم اليورياز Urease فى البيئة بواسطة البكتيرة ، فأن الأمونيا المنطلقة ترفع من قيمة pH . وبذلك يتغير لون دليل الفينول الأحمر من اللون الأصفر pH 6.8 إلى اللون الأحمر pH 8.1 أو أكثر .

أختبر أنبوبة مرق اليوريا الملقح بالبكتيرة *Proteus vulgaris* - ودون لون المزرعة .

يمكن الكشف عن الأمونيا الناتجة عن تحلل اليوريا فى بيئة مرق اليوريا الخالى من الكاشف الفينول الأحمر - وذلك بأضافة كمية محلول نسلر إلى المزرعة نلاحظ تكون راسب لونه أصفر أو أصفر غامق أو راسب بنى حسب كمية الأمونيا الناتجة (شكل ٤٤)..

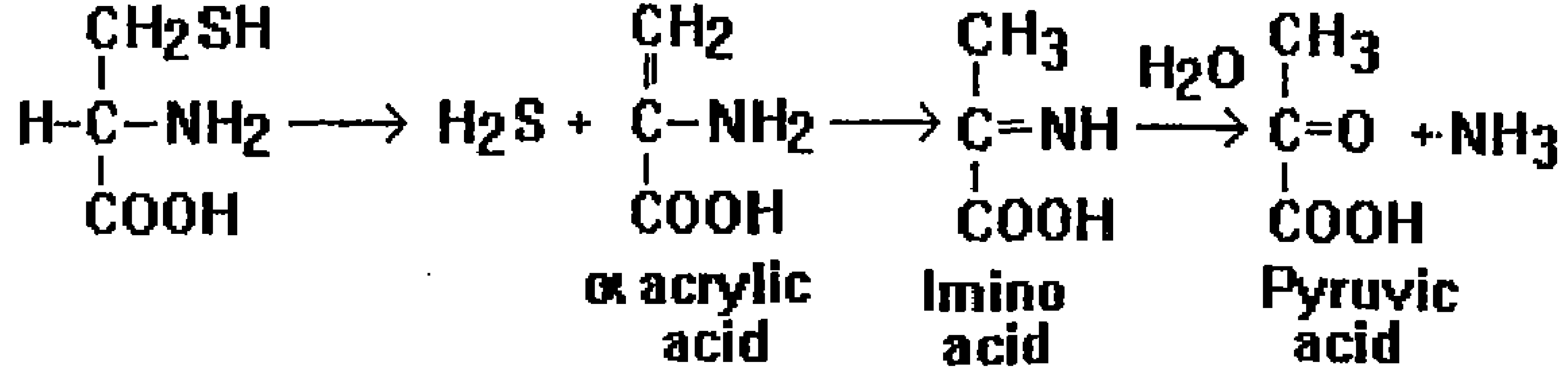
تحلل الأحماض الأمينية

الأحماض الأمينية وهى ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيرات أن تهاجم البعض منها محللة إياها إلى مواد أبسط تركيبا لها خواصها التى يمكن التعرف عليها ومن هذه الأحماض الأمينية ما يأتى :

أولاً : إختبار إنتاج كبريتوز الأيدروجين H_2S production

بعض البكتيرات مثل *Proteus vulgaris* تكون غاز كبريتوز الأيدروجين عند تحللها للحمض الأمينى سيستاين Cysteine وهذه البكتيرة تفرز أنزيم يعرف بأسم سستاين ديسلفوراز Cysteine desulforase .

وأنزيم سستاين ديسلفوراز يعمل بمساعدة المرافق الأنزيمى Pyrodoxal phosphate وتعتبر هذه الخطوة الأولى فى فصل الأمونيا من الحمض الأمينى .



بإستعمال بيئة كليجلر Kiligler's iron medium يمكنها أن تكشف عن إنتاج كبريتوز الأيدروجين حيث أنها تحتوى على كلوريد الحديدوز والذى يتفاعل مع H_2O ليكون راسب أسود من iron sulfide والبيئة تحتوى أيضاً على جلوكوز ولاكتوز وأحمر الفينول فهى يمكنها أيضاً الكشف عن قدرة تخمير الجلوكوز واللاكتوز .

ومن الأحماض الأمينية المحتوية على ذرات من الكبريت حمض السستين Cystine والسستاين Cysteine والتى عند تحللها ينطلق غاز كبريتوز الأيدروجين ذو الرائحة الكريهه المميزة والذى يمكن الكشف عنه أيضاً بطرق كيماوية بسيطة

وللكشف عن أنتاج غاز كبريتوز الأيدروجين يجرى التمرين الآتى :

التمرين التاسع والأربعون

١- حضر مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة لكل من *Proteus vulgaris* *E.coli* .

٢- حضر أنابيب آجار عميق من بيئة كليجلر Kligler المحتوية على كبريتات الحديدوز .

٣- لقح أنبوبتين بطريق الوخز بكل من المزارع البكتيرية وأحتفظ بأنبوبة ثالثة بدون تلقيح .

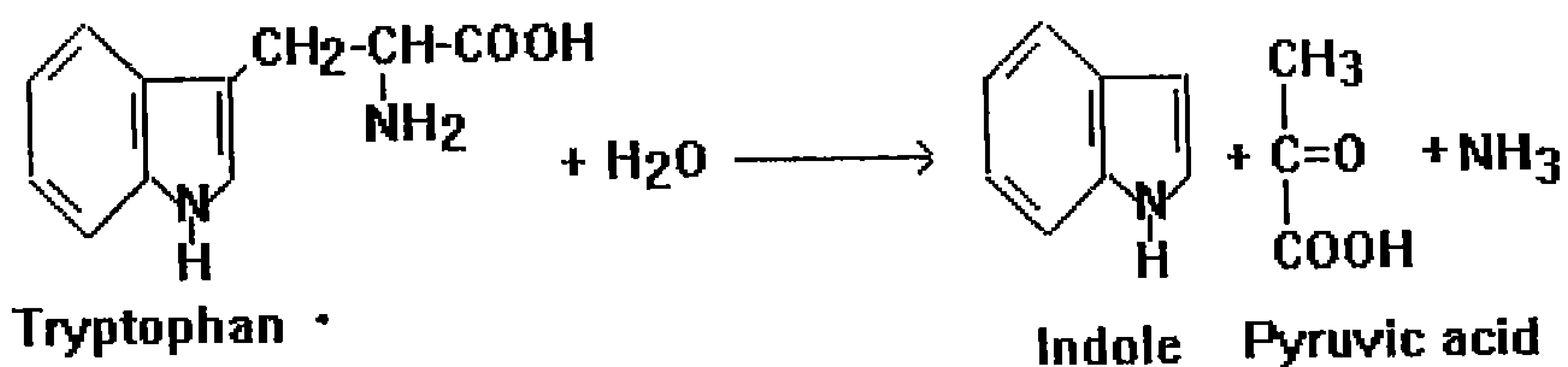
٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ١٧ يوم .

٥- أفحص الأنابيب لاحظ تكون لون أسود على طول خط التلقيح في حالة تكون غاز كبريتوز الأيدروجين (شكل ٤٥) كما لاحظ تغير لون البيئة من اللون الأحمر إلى اللون الأصفر نتيجة لأنخفاض قيمة الـ pH لتكون أحماض .

ثانياً: تحلل الأحماض الأمينية الحلقية

١- التربتوفان

بعض البكتيرات مثل *E.coli* لها القدرة على تحليل جزئ التربتوفان وتشطره إلى جزئ إندول وجزئ حمض بيروفيك بالأستعانة بالأنزيم Tryptophanase



وممكن الكشف عن الاندول الناتج بأستعمال كاشف كوفاك Kovack's reagent – وهذا الأختبار هام نظراً لأنه يميز البكتيره *E.coli* من بكتيرات القولون المشابه لها.هذا ونلاحظ أن بعض البكتيرات قد تظهر نتائج سلبية لهذا

الأختبار بالرغم من قدرتها على تحليل التربتوفان ولكن ذلك يرجع إلى قدرتها على تحليل الأندول الناتج أيضاً . وفيما يلى خطوات التمرين ٠

التمرين الخمسون

١- حضر مزرعة حديثة من كل من *E.coli* ، *Bacillus subtilis* .

٢- حضر ثلاثة أنابيب محتوية على بيئة مرق التربتون الغنية بالحمض الأمينى تربتوفان .

٣- لقح أنبوبة من البيئة بكل من البكتيريتين أترك أنبوبة ثالثة بدون تلقيح للمقارنة .

٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥- أكشف عن وجود الاندول بنقل ٤ مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إليها ٣, - ٤, مل من كاشف كوفاك . رج الأنبوبة ثم أتركها قليلاً ليطفو كاشف كوفاك إلى السطح مع تلون الطبقة السطحية من الأنبوبة باللون الأحمر الغامق فى حالة النتائج الأيجابية (شكل٤٦) ٠

٢- الفينايل الانين

تمتلك بعض البكتيرات أنزيم Phenyl alanine aminase ليفصل فيه مجموعة الأمين التى تنطلق فى صورة نشادر وتاركة مركب phenyl pyruvic والأخير يمكن الكشف عنه بأضافة كلوريد الحديديك فيتكون لون أخضر مميز - وفيما يلى خطوات الأختبار .

التمرين الواحد والخمسون

١- ضع ما يلى فى أنبوبة أختبار صغيرة : نقطتين من محلول ٠٣, جزيئى من الفينايل الانين ثم نقطتين من محلول٠٢٥, جزيئى منظم pH فوسفاتى pH6.4 ثم نقطتين من معلق كثيف لخلايا حديثة للبكتيرة المراد أختبارها.

٢- ضع الأنبوبة بالحضان على درجة ٢٨°م لمدة ساعتين .

٣- أضف نقطتين من محلول٥, جزيئى من كلوريد الحديديك إذا ظهر لون أخضر دل ذلك على وجود حمض Phenyl pyruvic الناتج عن إنحلال Phenyl alanine .

ثالثاً : تحلل الأرجينين Arginene hydrolysis

يتحلل هذا الحمض الأمينى مائياً بواسطة بعض البكتيرات منتجاً أمونيا يمكن الكشف عنها بواسطة محلول نسلر وفيما يلى خطوات الأختبار :

التمرين الثانى والخمسون

١- حضر أنابيب بيئة مرق الأرجينين وهى تتكون أساساً من ٥جم تربتون و٥جم مستخلص خميرة و٢جم فوسفات بوتاسيوم أحادى الأيدروجين و٣جم ل - أرجينين مونو هيدروكلوريد و ٥, جم دكستروز و ١٠٠٠ مل ماء مقطر أضبط pH إلى٧ pH٠عقم على درجة حراره ١١٥°م تحت ضغط ١٠رطل/بوصه٢ لمدة ١٠ دقائق .

٢- لقح أنابيب بيئة مرق الارجينين بالبكتيرة المراد أختيارها وتوضع بالحضان على الدرجة المناسبة للبكتيرة لمدة ٤٨ ساعة .

٣- يضاف قطرات من محلول نسلر إلى المزرعة - ظهور لون بنى يدل على تحلل الأرجينين فى البيئة .

رابعاً : الكشف عن الأنزيمات المزيلة لمجاميع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية Amino acid decarboxylases

التمرين الثالث والخمسون

١- ضع فى أنبوبة أختبار صغيرة ما يلى :

٢ نقطة من محلول ١٪ من حمض الليوسين أو الميثيونين .

٢ نقطة من محلول فوسفاتى منظم pH 5 .

٢ نقطة من محلول بروموكريزول أرجوانى .

٢ نقطة من معلق كثيف من خلايا حديثة السن للبكتيرة المراد دراستها.

٢- ضع الأنبوبة بالحضان على درجة ٢٨°م لمدة ٢-٦ ساعات إذا حدث تغير فى لون المخلوط دل ذلك على نشاط أنزيمات Decarboxylases .

التغيرات التى تحدثها الأحياء الدقيقة فى بيئة لبن عباد الشمس

تحدث الأحياء الدقيقة عدة تغيرات في بيئة عباد الشمس Litmus milk نتيجة لنموها عليه وتختلف البكتيرات فى قدرتها على إحداث هذه التغييرات.

إن بيئة لبن عباد الشمس Litmus milk تحتوى على ١٠٪ لبن مجفف خال من الدسم وكمية من دليل عباد الشمس Litmus كدليل لقيمة الـpH وعندما نحضر البيئة نضبط قيمة الـpH بها إلى ٦,٨ (وتعتبر بيئة غنية ومناسبة لنمو العديد من الكائنات ويمكن الأستعانة بهذا الأختبار فى التعرف على الكائنات المجهولة) وهذا الأختبار علاوة على أنه يظهر القدرة التخمرية للكائن من عدمه

إلا أنـه أيضـاً يختـبر القـدرة التحليليـة للبروتينـات (بروتيـن اللبــن - الكــازين) والعديد من الكائنات ذات القدرة الأختزالية تختزل عباد الشمس مؤدية إلى إزالـة لونه بدرجات مختلفة تبعاً لقدراتها الأختزالية فبعض الكائنــات تتطلـب ٤-٥ أيـام لإختزال عباد الشمس لذلك يجب أن تترك فى الحضان لفترة سـبعة أيـام تفحـص خلالها كل ٢٤ ساعة للبحث عن التفاعلات الأتية : كما يظهر فى شكل ٤٧ .

١- تفاعل حمضى Acid reaction

يتحول لون لبن عباد الشمس إلى اللون الأحمر وهو أختبار مثالى للبكتيرات المخمرة لسكر اللاكتوز Fermentative organisms .

٢- تفاعل قلوى Alkaline reaction

يتحـول لون لبن عباد الشمس إلــى اللــون الأزرق أو قرمـزى والكثير من البكتيرات المحللة للبروتينات تظهر هذا التفاعل خلال ٢٤ ساعة الأولى .

٣- أختزال عباد الشمس Litmus reduction

تصبـح المزرعـة بيضـاء اللـون (أى عديمـة اللـون) ويحـدث ذلـك مـع البكتيرات النشطة التكاثر حيث أنها تقلل القدرة التأكسدية الأختزالية للمزرعة .

٤- التخثر Coagulation **أو التجبن**

يتكون خثرة Curde حيث تتصلب البيئة وذلك نتيجة لتخثر البروتين - وأمالة الأنبوبة ٤٥ درجه تبين ما إذا كان حدث تخثر من عدمه .

٥- هضم كازين اللبن أو البيتنة Peptonization

عندمـا تفقد البيئـة تماسكها ويصبـح اللبـن رائـق ويتحـول إلــى اللــون الاصفر(مثـل لـون المشـمش أو القش) وهـذا يتـم نتيجـة لفعـل أنزيمــات هضـم البروتين . ولذلك أستغل هذا الأختبار فى الأغراض التصنيفية .

التمرين الرابع والخمسون

١- حضر مزرعة عمرها ٢٤ساعة من كل من البكتيرات الآتية :
Streptococcus lactis , Bacillus subtilis , E.coli

٢- جهز ٤ أنابيب من بيئة لبن عباد الشمس .

٣- لقح ٣ أنابيب كل بكائن من الكائنات السابقة . أترك الرابعة بدون تلقيح للمقارنة .

٤- ضع الأنابيب في الحضان على درجة ٣٧°م لمدة أسبوعين مع الفحص الدورى كل يومين بحثاً عن التغييرات التى تحدث للبيئة .

ويمكن تلخيص التغيرات التى يمكن حدوثها لبيئة اللبن فيما يلى:

(أ) **أنتاج أحماض أو قلويات** : يتغير لون دليل عباد الشمس إلى اللون الأحمر فى الوسط الحمضى واللون الأزرق الغامق فى الوسط القلوى .

(ب) **التجبن** : يكون التجبن حمضيا وذلك بتكوين خثرة حمضية لترسيب كازينات الكالسيوم الغروية نتيجة لتكوين الأحماض العضوية وفى هذه الحالة يتغير لون الدليل إلى الأحمر مع تكون شرش واضح بينما يتكون التجبن إنزيمياًوتتكون خثرة أنزيمية متماسكة وملساء (بارا كازينات الكالسيوم) نتيجة لأفراز أنزيم أو أنزيمات مماثلة للرنين Rennin بواسطة البكتيرات فى وجود أيونات الكالسيوم ولا يتغير فى هذه الحالة لون الدليل حيث تظل البيئة متعادلة .

(جـ) **تكوين غازات**:عند تكوين الغازات يحدث تثقيباً للخثرة المتكونة .

(د) **هضم كازين اللبن**: Peptonization ويطلق على هضم وتحويل كازين اللبن غير الذائب وتحويله إلى مركبات ذائبة أسم Peptonization ويلاحظ ذلك بأن يصبح اللبن رائق لهضم الكازين وملون بلون أصفر (مثل لون المشمش أو القش).

(هـ) **أختزال صبغة عباد الشمس** : ويستدل عليه فى أختفاء لون الدليل نتيجة لأختزاله بحيث تصبح البيئةعديمة اللون.ويبدأ الأختزال قرب قاع الأنبوبة.

وقد تشاهد حلقة حمراء باهتة اللون بين المنطقة المختزلة وغير المختزلة من البيئة .

الأكسدة البيولوجية Biooxidations

إن التفاعلات التى يطلق عليها الأكسدة البيولوجية يقصد بها تلك التفاعلات الأنزيمية المختصة بعمليات التنفس والتخمر .

إن الخلاف الأساسى بين البكتيريات الهوائية أجبارا Oxidative والبكتيرات الأخرى هو أن الأولى تحصل على الطاقة اللازمة لها عن طريق التنفس أما البكتيرات الأخرى فهى إما تحصل على طاقتها عن طريق التنفس أو عن طريق التخمر Fermentative .

التنفس Respiration

يمكن تعريف التنفس بأنه العملية الموفرة للطاقة والتى تعمل فيها المواد العضوية كمعطيات الكترونية وأن الأكسجين الجزيئى الحر يكون المستقبل الوحيد للألكترونيات (أو للأيدروجين) والكائنات الهوائية تتميز بقدرتها على أكسدة المواد العضوية منتجة لغاز ثانى أكسيد الكربون والماء كناتج لعملية الأكسدة . وهذه القدرة على أستعمال الأكسجين تكون مصحوبة بأستغلال مجموعة من النظم السيتوكرومية.

والكائنات المخمرة Fermentative تستعمل المواد العضوية كمصدر للطاقة وينتج عن ذلك مواد قابلة للأكسدة أو الإختزال كناتج نهائى . وفى هذه الحالة تعمل المواد العضوية كمعطية وأيضاً مستقبلة للألكترونات وهذه النواتج النهائية قد تكون أحماض أو الدهيدات أو كحولات – هذا وبعض الغازات مثل ثانى أكسيد الكربون والأيدروجين والميثان يمكن أن يشملها نواتج التخمر .

ويمكن إذاً أن تعرف عملية التخمر بأنها عملية أكسدة بيولوجية للحصول على الطاقة والتى تعمل فيها المواد العضوية كمعطيات ومستقبلات للألكترونات (الأيدروجين) وكذلك ومن الملاحظ أن عمليات التخمر هذه لا تستعمل أو تستقبل أى نظم سيتوكرومية .

والسكريات وبخاصة الجلوكوز تعتبر المواد العضوية الأكثر أستغلالاً بواسطة البكتيرات المخمرة.إلا أن بعض المواد الأخرى مثل الاحماض العضوية، والأحماض الأمينية ، والبيورينات ، والبريميدينات يمكن لبعض البكتيرات أن تخمرها أيضا .

هذا والنواتج النهائية لعمليات التخمر تتحد تبعاً لطبيعة الكائن البكتيرى المخمر، ونوعية المادة المستعملة فى التخمر والظروف البيئية المصاحبة كالحرارة والحموضة أو القلوية .

ولما كانت عملية التخمر تتم تحت ظروف غير هوائية إلا أنه يجب أن نعلم أن الكائنات الأختيارية تغير من عملياتها الأيضية التى من شأنها أنتاج الطاقة عند وجود الهواء فقد لوحظ أن هذه الكائنات تكون مخمرة فى غياب الهواء ثم تتحول إلى كائنات تنفسية فى وجوده . إلا أنه هناك بعض الشواذ مثل الحال فى بكتيرات حمض اللاكتيك والتى تقوم بعمليات التخمر فى وجود الهواء. وهناك مجموعة من الأختبارات لدراسة الأكسدة البيولوجية .

١ـ أختبار إنتاج أنزيمات الأوكسيداز

إن أختبار إنتاج الأوكسيداز واحد من أهم الأختبارات المفرقة بين المجاميع البكتيرية . فمثلاً البكتيرات التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae* تعتبر سالبة لهذا الأختبار ومعظم أنواع ألجنس *Pseudomonas* تعتبر موجبة له وفيما يلى خطوات الاختبار :

التمرين الخامس والخمسون

١-لقح عن طريق التخطيط بيئة آجار الجلوكوز بالبكتيره *Pseudomonas aeruginosa* ثم ضعها بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة .

٢- أغمر سطح المزرعة لبعض المستعمرات بقليل من محلـول أختبـار الأكسيداز وهـو عبـارة عـن محلـول ١٪ مـن داى مثيـل فينيليـن داى أميـن هيدروكلورايد Dimethyl phenylenediamine hydrochloride ٠

لاحظ أن مستعمرات الـ *Pseudomonas* الموجبـة لهـذا الأختبـار تصبـح وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء غامقة ثم سوداء شكل ٤٨ .

٢ـ أختبار إنزيمات dehydrogenases أو أختبار أزرق المثيلين ٠

التمرين السادس والخمسون

١- حضر مزرعة حديثة مـن البكتـيره *E.coli* ناميـة فـى بيئـة آجـار مغذى .

٢- علق النمو الناتج فى ١٠ مل من الماء المقطر المعقم .

٣- حضر أنبوبتين نظيفتين وضع بكل منهما ما يلى :

١مل محلول ١٪ جلوكوز ٠

١مل محلول ١٠ -٤ من صبغة أزرق المثيلين ٠

١مل محلول فوسفاتى منظم للـ pH (pH ٧) ٠

٤- أضف إلى أحد ألأنابيب ١مل من معلق الخلايا فى الماء المقطـر - وفى الأنبوبة الثانية ١مل من ماء مقطر ومعقم فقط للمقارنة .

٥- ضع بسرعة ٢مل من زيت البرافين فوق المخلوط بعد رجه جيدا .

٦- ضع الأنابيب فى حمام مائى على درجة ٣٧°م .

٧- أحسب الوقت اللازم لإختفاء اللون الأزرق من الأنبوبة الأولى .

إخـتزال لـون صبغـة أزرق المثيليـن يرجـع إلـى نشـاط إنزيمـات الديهيدروجيناز فى وجود مادة تفاعل عضوية وهى الجلوكوز وعادة يجرى هذا الإختبار بسرعة للتعرف على مـدى تلـوث اللبـن بالميكروبـات فكلمـا قـل الوقـت اللازم لإختزال الصبغة كلما دل ذلك على شدة تلوث عينة اللبن المختبر .

٣ـ أختبار الكاتاليز Catalase Production test

معظم الكائنات الهوائية أجباراً والهوائية أختياراً والتى تستعمل الأكسجين تنتج فوق أكسيد الأيدروجين وأستمرار وجودها ونموها فى وجود هذا الناتج السام Antimetabolite يرجع إلى إمتلاكها إنزيم الكاتاليز الذى يحلل فوق أكسيد الأيدروجين .



$$2H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O_2$$

ولقد كان معروفاً أن موت الكائنات غير الهوائية أجباراً وبخاصة أنواع الـ *Clostridium* عند تعرضها للأكسجين يرجع إلى تكون المادة الأنتحارية (فوق أكسيد الأيدروجين) وفى غياب إنزيم الكاتاليز الذى لا تحتويه هذه الكائنات ولكن ثبت عدم صحة هذا الأفتراض لأن البكتيرات المتحملة لتركيزات منخفضة من الأكسجين Aerotolerant والتى تفتقر أيضا لأنزيم الكاتاليزلا تتسمم فى وجود الأكسجين والبحوث الحديثة أثبتت أن المادة السامة المتكونة هى عبارة عن نوع معين (أصل حر نشط جداً Highly reactive free - radical) من الأكسجين O_2 يعرف O_2 بالـ Superoxide وهذا المركب يتحلل بواسطة أنزيمات فلافينيه (فلافوبروتين) تعرف بأسم Superoxide dismutase والتى تكسر هذا السوبر أوكسيد إلى ماء وأكسجين طبقا للمعادلة التالية :



$$O_2^- + 2H \xrightarrow{Superoxide\ dismutase} H_2O + O_2$$

وهذا الأنزيم موجود فى الكائنات الهوائية والمتحملة لضغوط منخفضة من الأكسجين Aerotolerant ولكن لا يوجد فى الكائنات غير الهوائية إجبارا .

التمرين السابع والخمسون

١- حضر مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة وأخرى قديمة بعمر أسبوعين من كل من *Streptococcus lactis* ، *E.coli* .

٢- أغمر سطح المزرعة بكل انبوبة بكمية كافية من محلول ٣٪ فوق أكسيد أيدروجين .

٣- لاحظ تصاعد فقاعات من المزارع الحديثة نتيجة لإنطلاق غاز الأكسجين بفعل إنزيم الكاتاليز .

أختزال النترات :

الكثير من البكتيرات الإختيارية وبخاصة الـ (*Nitrobacter*) لها القدرة على إستعمال الأكسجين الموجود بالنترات حيث تعتبر الأخيرة مستقبل جيد للأيدروجين وبذلك تتحول النترات إلى نيتريت وهذا التفاعل يتحكم فيه أنزيم يعرف بأسم Nitrase .



$$NO_3 + 2\bar{e} + 2H^+ \longrightarrow NO_2^- + H2O$$

وحيث أن وجود الأكسجين الحر يمنع أختزال النترات بالطريقة السابقة الذكر - فإن الكائنات المصاحبة للبكتيرات المختزلة للنترات تعمل على أستهلاك الأكسجين المحيط بالبيئة أولاً لتسمح للـ *Nitrobacter* بالعمل على أختزال

النترات ومن المستحسن عند أجراء اختبار اختزال النترات أن نوفر ظروف غير هوائية وفيما يلى خطوات أجراء الإختبار :

التمرين الثامن والخمسون

١-جهز مزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من كل من: *E.coli,Bacillus subtilis*

٢- لقح بكل من المزارع السابقة الذكر انبوبة من بيئة مرق النترات ثم أترك إنبوبة ثالثة بدون تلقيح للمقارنة - ضع ٢مل زيت برافين فوق المخلوط .

٣- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ثم أكشف عن النيتريت فى المزارع الناتجة .

وبيئة مرق النترات تتكون من :

مستخلص لحم	٣ جم
ببتون	٥ جم
نترات بوتاسيوم	١ جم
ماء معطر	١٠٠٠ مل

٤ـ انقل ٣مل من المزرعة من تحت الزيت إلى انبوبة نظيفة ثم أضف إليها ١مل من محلول A وهو عبارة عن حمض السلفونيك Sulphonic acid ثم ٢/١ مل من محلولB وهوعبارة عن داى ميثيل نافثال أمينDimethyl Naphthal amine .

٥- ظهور لون أحمر وردى يدل على وجود النيتريت Nitrite شكل ٤٩ والنتائج السلبية يجب أن تؤكد بأضافة محلول من سلفات الزنك - ووجود الزنك يعمل على أختزال النترات الموجودة غير المختزلة إلى نيتريت وهذه تتفاعل مع المحاليل الكاشفة المضافة وتكون لون أحمر.

تخمر الكربوهيدرات

تختلف البكتيرات أختلافا كبيرا فى قدراتها التخميرية للمواد الكربوهيدراتية فبعضها يمكنه أكسدة السكريات البسيطة مكونا حمض وغاز والبعض الآخر يخمر نفس السكر وينتج أحماضا فقط . فى حين أن البعض الآخر يكون غير قادر كلية على تخمير هذا السكر . والمعلومات الخاصة بقدرة الكائن البكتيرى التخمرية للسكريات أو المواد الكربونية المختلفة تعتبر هامة جدا للتعرف على البكتيرات وتصنيفها . والغرض من التمرين التالى إظهار قدرة البكتيرات على تخمر السكريات وأى من السكريات تخمر أو لا تخمر مع مراعاة تكوين أحماض أو غازات بصفة عامة وبصرف النظر عن نوعية هذه الأحماض أو الغازات – ويمكن الكشف عن الأحماض بأضافة دليل للـ pH – أما الغازات المتكونة يمكن تجميعها فى أنبوبة دورهام Durham التى توضع مقلوبة فى الإنبوبة التى يتم فيها التخمر حيث تتجمع بها الغازات الناتجة .

التمرين التاسع والخمسون

١- حضر مزارع حديثة النمو (٢٤ ساعة) نامية على بيئة آجار مغذى من البكتيرات الآتية :

E. coli , *Bacillus subtilis* , *Pseudomonas marginata* .

٢- حضر أنابيب دورهلم محتوية على ٩مل من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين غيرعضوى مع دليل أزرق البروموثيمول Bromthymol blue (أنظر ملحق البيئات) أو من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين عضوى والمضاف إليها دليل البروموكريزول الأرجوانى Bromocresol purple، وتعرف البيئة الأخيرة باسم قاعدة المرق القرمزى Purple broth base ثم ضع بداخل كل أنبوبة أنبوبة دورهام الصغيرة مقلوبة

(قد تختلف نتائج تخمر السكريات حسب نوع البيئة المستعملة وخاصة فى حالة البكتيرات التابعة للجنس *Pseudomonas*).

٣- حضر محاليل من السكريات بتركيز ٢٪ والآتى بيانها بعد تعقيمها، بالترشيح أو باستعمال التعقيم البخارى المتقطع خاصة فى حالة السكريات الثنائية: أرابينوز - جلوكوز - لاكتوز - سكروز - مالتوز

٤- أضف إلى البيئة بكل أنبوبة ١مل من محلول السكر المعقم والمراد إختبار تخمره ليصبح تركيز السكر بالبيئة ٢, ٪ .

٥- لقح أنبوبتين من كل سكر من المزرعة المراد أختبارها .

٦- ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة أسبوع أو أكثر .

٧- إفحص الأنابيب دوريا كل ٤٨ ساعة باحثا عن تغير لون البيئة إلى اللون الأصفر عند تكون أحماض وتجمع فقاقيع غازية فى أنابيب دورهام ، الصغيرة الداخلية عندما تتكون غازات (شكل ٥٠)

٨- دون نتائجك فى جدول مناسب .

التخمر الحمضى المختلط Mixed acid fermentation

أختبارأحمر الميثيل Methy Red Test

إن الكثيرمن البكتيرات السالبة لجرام والتى تعيش فى أمعاء الأنسان يمكن أن تميز بعضها عن بعض على أساس نواتج تخميرها للجلوكوز ونكشف عن ذلك باختبار أحمر الميثايل عندما تنمى فى بيئة أحمر الميثيل - فوجس بروسكاور MR-VPmedium وأفراد الأجناس الآتية , *Proteus* , *Salmonella* *Escheriehia* , *Aeromonas* يمكنها أن تخمر الجلوكوز مكونة كميات كبيرة من حمض اللاكتيك وحمض الخليك وحمض السكسنيك وحمض الفورميك علاوة على غاز ثانى أكسيد الكربون والأيدروجين وكحول الأيثايل .

وتكدس هذه الأحماض بالبيئة من شأنه خفض قيمةpH إلى٠, ٥ أو أقل. فإذا أضيف للمزرعة أحمر الميثيل كدليل فأن المزرعة تتخذ اللون الأحمر

مباشرة شكل ٥١ مـايدل علىأن الميكروب عبارة عن Mixed acid fermenter . وهذه الكائنات تعتبر منتجة للغـازات بدرجـة كبيرة لأن لهـا القدرة علـى إنتـاج إنزيم Formic hydrogenylase. وهذا يدل أيضا علـى وجـود حمـض الفورميـك بكميات قليلة .



$$H\text{-}COOH \xrightarrow{\text{formic hydrogenylase}} H_2 + CO_2$$

إختبار فوجس بروسكاور

يجرى هذا الإختبار للكشف عن المركب المتعادل التأثير (أسـتيل ميثيـل كربينول CH3-C(=O)-CH(OH)-CH3 والـذى يعـرف أيضـاًباسـم Acetoin) أى أن الإختبـار يكشف عن وجود مادة متعادلة ، فإن وجدت هذه المـادة كـان الإختبـار موجبا – والعكس صحيح .

هـذا والأختبـارات السـالبة مـن اختبـارأحمر الميثيـل قـد تبيـن أن الكـائن المختبر ينتج بدلاً من الأحماض كميات كبيرة من 2,3 butanediol وكمية كبـيرة من كحول الإيثايل – والكثير من انواع *Bacillus* , *Enterobacter* , *Aeromonas* , *Erwinia* , تفعل ذلك ، وإنتاج مثل هذه المـواد غير الحمضيـة تعمـل علـى عـدم خفض قيمة pH بالدرجة التى يكشفها دليل أحمر الميثيل – ولا يوجد مايدل علـى وجود مادة 2,3 utanediol إلا أن مادة (Acetyl methyl carbenol) acetoin وهـى مادة أولية لتكوين 2,3 butanediol يمكن التحقق مـن وجودهـا بأسـتعمال كاشـف باريت Barritt's reagent وهذا الكاشـف يتكـون مـن الفانـافثول+ KOH الميثيـل وعند أضافتها إلى مزرعة بعمر٤٨ساعة نامية فى بيئة أحمـر الميثـايل– فوجـس بروسـكاور– ويسـمح لهـا بعـض الوقـت لأن لـون المزرعـة يتحـول إلـى اللــون الوردى أو الأحمر فى حالـة وجـود Acetoin شـكل٥٢ وحيـث أن كـل مـن 2,3 Butanediol , Acetoin تتواجد تباعاً فإن الأختبار يمكن أن يكون كافياًللكشـف عن المركبين . ويعرف هذا الأختبار كما سبق أن بينا بإسم Voges Proskaur test .

التمرين الستون

١- حضر مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من كل من *E.coli , Aerobacter aerogenes*

٢- حضر ٣ أنابيب بيئة فوجس بروسكاور - أحمر الميثايل (راجع ملحق البيئات) .

٣- لقح أنبوبة بكل مزرعة مع ترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة .

٤- ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥- بعد أنتهاء فترة التحضين أكشف عن مادة الأسيتايل ميثيل كاربينول بنقل ١مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إلى الأنبوبة ١/٢ مل من محلول باريت (أ) Barritt A ، ١/٢ مل من محلول باريت(ب) Barritt B (أنظر ملحق المحاليل) . رج محتويات الأنبوبة وأتركها معرضة للهواء لمدة ٥ - ١٥دقيقة. لاحظ تكون لون أحمر وردى بالأنبوبة ليدل على وجود مادة الأسيتايل ميثيل كاربينول (شكل ٥٢).

ملحوظة : في التفاعلات السلبية لا يحدث تلون بالأنبوبة لمدة ساعة إلا أنه قد يظهر لون وردى بعد ذلك نتيجة لتفاعل بوايد ، مع الألفانفثول .

٦- أكشف عن تكون أحماض بالمزرعة ، وذلك بأضافة عدة نقط من دليل أحمر الميثيل إلى ما تبقى من المزرعة لاحظ تكون لون أحمر غامق (رقم pH ٤،٦ أو أقل) إذا كان الأختبار موجباً (شكل ٥١) .

أختبار تكون حمض البيوتيرك

بعض الأنواع البكتيرية تتميز بأحداث تخمر بيوتيرى للسكريات بمعنى أن حمض البيوتيرك Butyric acid (CH_3-CH_2-CH_2-COOH)يكون ضمن المواد العديدة الناتجة عن تخمر سكر الجلوكوز أو غيره من السكريات وعادة يتم تكون هذا الحمض عند سيادة الظروف غير الهوائية . وقد تلوث مثل هذه البكتيرات اللبن محدثة به تخمرا مماثل يعرف بالتخمر البيوتيرى .

التمرين الواحد والستون

١- حضر أنابيب من بيئة اللبن الفرز المضاف إليه البروموكريزول الأرجواني .

٢- لقح أنبوبة بمزرعة حديثة من البكتيره *Clostridium butyricum* وأنبوبة أخرى بالبكتيره *E.coli* . أحتفظ بأنبوبة ثالثة دون تلقيح للمقارنة .

٣- أضف إلى كل أنبوبة كمية قليلة من مسحوق كربونات الكالسيوم .

٤- صب كمية كافية من مزيج فاسبار المنصهر فوق سطح البيئة ثم أترك الأنابيب فى وضع قائم ليتصلب مزيج فاسبار .

٥- ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة ٢-٤ يوم .

٦- تخلص من طبقة الفاسبار وذلك بتسخين الأنبوبة قليلاً مقابل المزيج المتصلب ثم أنزع الكتلة المتصلبة بواسطة أبرة التلقيح .

٧- لاحظ لون ورائحة البيئة. تغير لون الدليل إلى الون المصفر. وظهور رائحة تشبه رائحة الزبد المتزنخ تدل على وجود حمض البيوتيرك .

إختبار تكوين كحول الإيثايل :

قد يمثل كحول الايثايل وثانى أكسيد الكربون أهم ناتج لتخمر السكريات عن طريق بعض الكائنات الحية الدقيقة كما فى حالة الخميرة . أو قد يكون واحداً من النواتج العديدة لتخمر السكريات بواسطة كثير من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى مثل بعض البكتيرات كبكتيرات القولون . وتستغل هذه الظاهرة فى بعض الصناعات الغذائية كإنتاج المشروبات الكحولية وإنتاج الكحول.

التمرين الثانى والستون

١- حضر مزارع عمرها أسبوع من الكائنات الحية الآتية : *Saccharomyces cerevisiae , E.coli* النامية فى بيئة مرق خلاصة المولت .

٢- إختبر فى المزرعة لوجود كحول الايثايل بنقل ٥مل من المزرعة (يراعى عدم رج المزرعة) إلى أنبوبة نظيفة.أضف إليها ٤نقط من محلول NaOH ١٠٪ثم أضف عدة نقط من محلول اليود المركز(راجع ملحق المحاليل). لاحظ تكون راسب أصفر من اليود وفورم CHI_3 فى حالة وجود كحول الإيثايل.

إذا لم يتكون الراسب مباشرة يمكن تسخين المخلوط إلى درجة ٦٠°م لمدة ١دقيقة ، إذا لم يتكون الراسب بعد ذلك فإن ذلك دليل على غياب كحول الإيثايل من المزرعة .

تحلل الأسكيولين Aesculin hydrolysis

التمرين الثالث والستون

١- حضر بيئة الأسكيولين وهى تحضر كالآتى :أضف إلى ١٠٠مل مرق الببتون ١ ,٠ جرام من الأسكيولين و٠,٥ جرام سترات الحديديك وتوضع فى أنابيب وتعقم فى الأتوكلاف على ١١٥°م لمدة ١٠ دقائق.

٢- لقح أنابيب بيئة الأسكيولين وتحضن الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة بالبكتيره المختبره .

٣- الكائن الذى يحلل الاسكيولين يؤدى إلى تلوين البيئة بالون الأسود . وتحلل الإسكيولين يتم بواسطة إنزيم B-glucosidase .

إنتاج مواد مختزلة من السكروز

Production of reducing substance from sucrose

التمرين الرابع والستون

١- حضر بيئة تتكون من ١٠جرام ببتون و ٥جرام مستخلص لحم و٤٠ جرام سكروز و١٠٠٠مل ماء . وتعبأ فى أنابيب وتعقم فى الأوتوكلاف .

٢- لقح الأنابيب التى تحتوى على بيئة السكروز السابق تجهيزها بالكائن البكتيرى المراد أختباره وتحضن المزارع لمدة ٤٨-٧٢ ساعة .

٣-بعد التحضين أضف إلى ٢مل من المزرعة إلى ٢مل من محلول بندكت فى أنبوبة إختبار . ضع الأنبوبة فى ماء يغلى لمدة ١٠ دقائق .

٤- ظهور لون أصفر إلى بنى يدل على أن الأختبار موجب وتكونت مادة مختزلة من السكروز .

إنتاج ٢ – كيتوجلوكونات : Production of 2- Ketogluconate

التمرين الخامس والستون

١- حضر بيئة سائلة مكونة من تريبتون ١٥, ٪ ومستخلص خميرة ١, ٪ وفوسفات بوتاسيوم أحادية الإيدروجين ١, ٪ وجلوكونات الكالسيوم ٤٪ . تعبأ البيئة فى دوارق مخروطية ٥٠مل من البيئة لكل دورق وتعقم فى الأتوكلاف .
٢- لقح البيئة فى الدوارق بلقاح من مزرعة حديثة من البكتيره وتحضن المزارع عند ٣٠°م وتختبر لإنتاج ٢-كيتوجلوكونات بعد ٥ أو ١٠يوم بإتباع الطريقة الأتية:

التمرين السادس والستون

١- أضف ١٠مل من محلول بندكت إلى ١مل من المزرعة .
٢- سخن فى حمام مائى (١٠٠°م) لمدة ١٠ دقائق .
٣- برد بسرعة وتترك ١٢ساعة . إنتاج راسب برتقالى أو بنى يدل على أن الإختبار موجب .

إنتاج الليفان Levan production

التمرين السابع والستون

١- حضر بيئة آجار مغذى مضاف إليها ٥٪ سكروز .
٢- صب بيئة آجار السكروز فى أطباق بترى معقمة. وبعد تصلب البيئة تلقح بطريقة التخطيط البسيط بلقاح مخفف من الكائن البكتيرى المراد إختباره . وتحضن الأطباق لمدة ٤٨ ساعة .
٣- إذا ظهرت المستعمرات بلون أبيض وتكون مخاطية شديدة التحدب يكون دليلاً على إنتاج الليفان .

التعرف على الأنواع البكتيرية

Identification of Bacterial Species

بعد عزل كائن بكتيرى مافى مزرعة نقية فإنه يمكن تحديد نوعه وذلك عن طريق مجموعة من الدراسات تشمل الصفات الظاهرية للخلايا Morphological characteristics والصفات المزرعية Cultural characteristics والأختبارات الفسيولوجية Physiological tests ، علاوة على أختبار القدرة الممرضة Pathological properties للكائن المعزول .

وبعد الحصول على نتائج هذه الدراسات والإختبارات تسجل في لوحة تصنيف البكتيرات.وبالرجوع إلى صفات البكتيرات الأخرى الشبيهة والتى سبق دراستهاووصفها وتصنيفها وتسميتها، يمكن تعيين نوع المزرعةالنقية المجهولة،

ويمكن التعرف على السلاله المجهوله بمقارنتها بسلاله معلومه وتحسب درجة التشابه أو التطابق مع صفات السلالاتين بتقدير معامل يطلق عليه معامل التشابه Similarity coefficient طبقاُ لمعادلة سنيث Sneath التى يتجاهل فيها الإختبارات ذات النتائج السلبية والمشتركة بين السلالتين التى تحت المقارنة. وفى هذه المعادلة يحسب عدد الأختبارات الايجابية المشتركة بين كل من السلالتين مقسوما على مجموع الصفات أو الأختبارات فى كلا السلالتين :

$$\text{معامل التشابه} = \frac{\text{أ}}{\text{أ} + \text{ب} + \text{جـ}}$$

أ = عدد الصفات أو الأختبارات الايجابيه النتائج المشتركة بين السلالتين تحت المقارنة .

ب = عدد الصفات أوالأختبارات الإيجابية النتائج الخاصة بأحد السلالتين.

جـ = عدد الصفات أو الأختبارات ذات النتائج الأيجابية الخاصة بالسلالة الأخرى.

ويفضل أحتساب معامل التشابه كنسبة مئوية ويطلق عليها حينئذ Similarity index فعندما تكون قيمته ١٠٠٪ فإن ذلك يعنى تطابق تام بين السلالتين وعندما تكون القيمة صفر٪ يعنى عدم وجود تشابه أطلاقاً .

وهنـاك معـامل آخـر يعـرف بأسـم معـامل المضاهـاه Matching coeffecient وفيه يؤخذ فى الأعتبار عدد الأختبارات أو الصفات السـلبية النتـائج ومن أهم المراجع التى يرجع إليها فى هذا الصدد هو مرجع Bergey .

أستعمال مرجع بيرجى

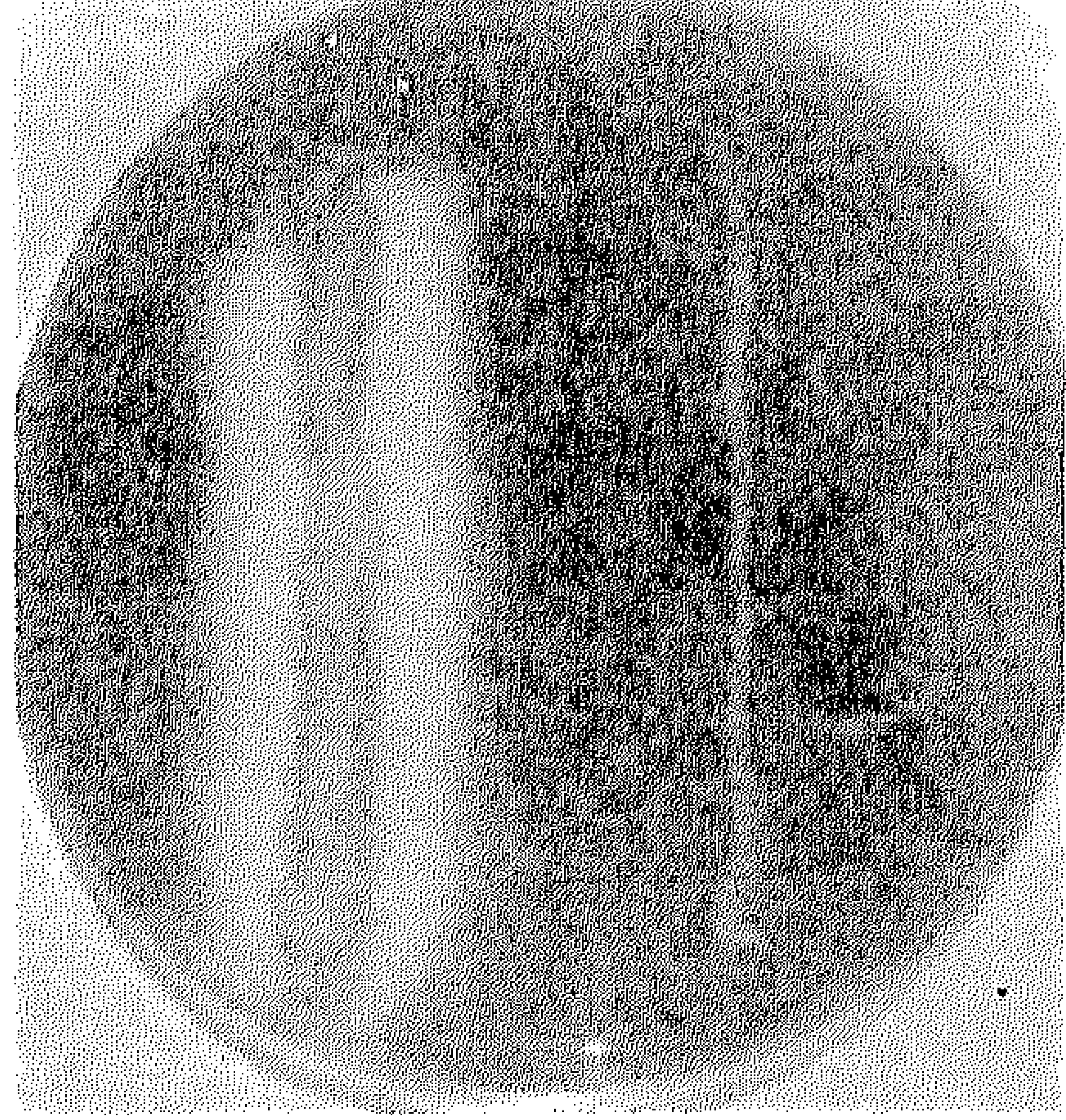
إن مرجع بيرجى Bergey's manual for Determinative Bacteriology هو المرجع الوحيد المعتمـد للتعـرف علـى البكتـيرات ، وبـالرغم مـن أنـه يشـمل وصف لكل البكتيرات المعروفة إلا أنه هناك العديد مـن البكتـيرات التـى ستضم إليه بالمستقبل – وهذا المرجع فى طبعته حالياً (الطبعة التاسعة) هى ناتج مجهود ١٣١ عالم ينتمون إلى ١٥ دولة .

وقـد تولـى هيئـة التحريـر تسـعة مـن العلمـاء تولـوا تنظيـم وتجميـع المعلومات التى أشتمل عليها .

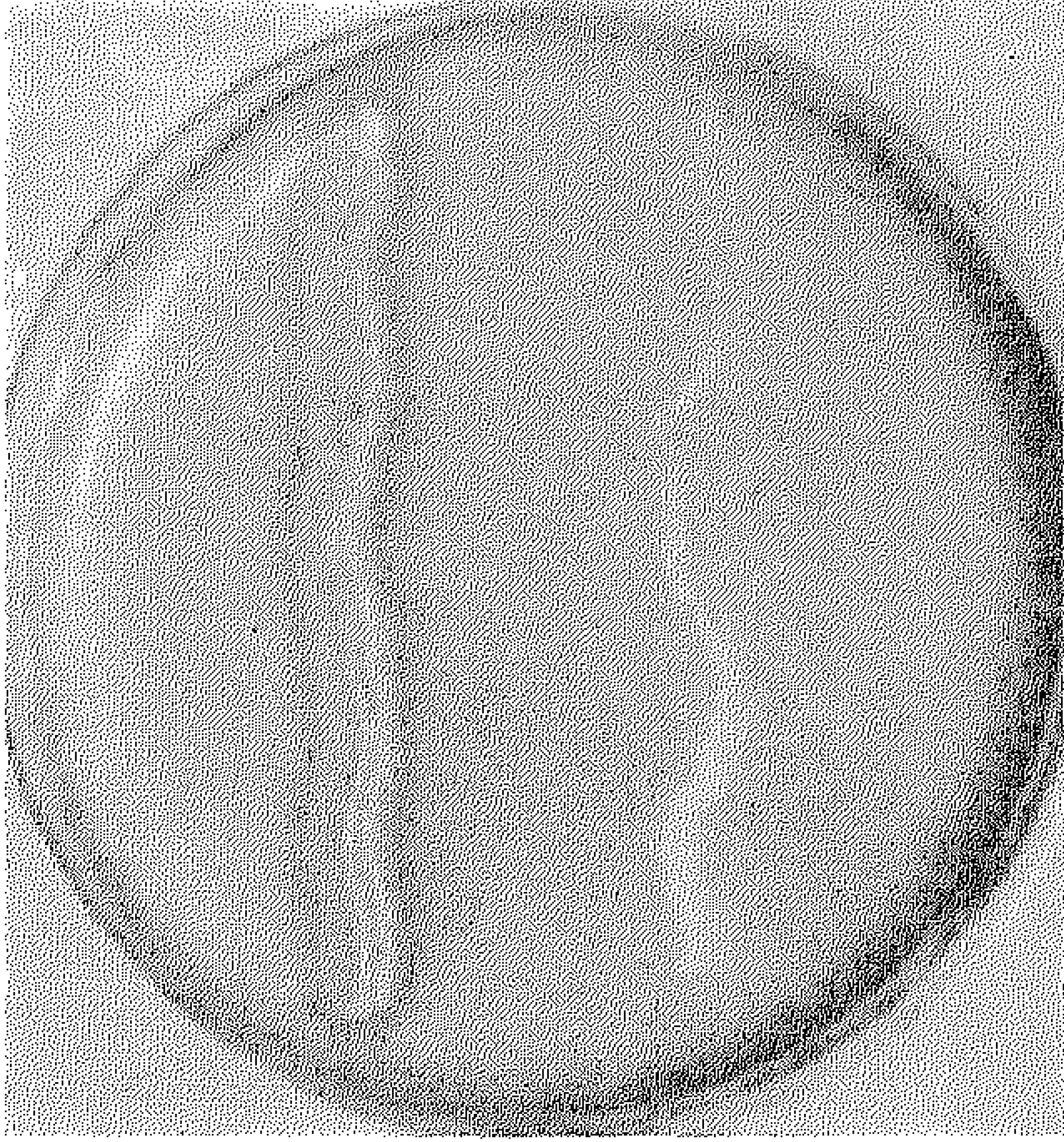
نظام الأجزاء The Parts System

وحيث أن البكتيرات لم تترك تسجيلات حفرية (Fersil secords) التـى يمكـن الأسـتعانة بهـا فـى الدراسـات الفيللوجينيـة(أى التـى ترجـع إلىالأصـول والأجداد) لذا فـأن تقسـيم البكتـيرات تـم علـى أسـس واقعيـة وليـس علـى أسـس تطورية . والأسس الأخيرة هى التى مكنت علمـاء النبـات وعلمـاء الحيـوان مـن تقسيم وتصنيف النباتات والحيوانات .

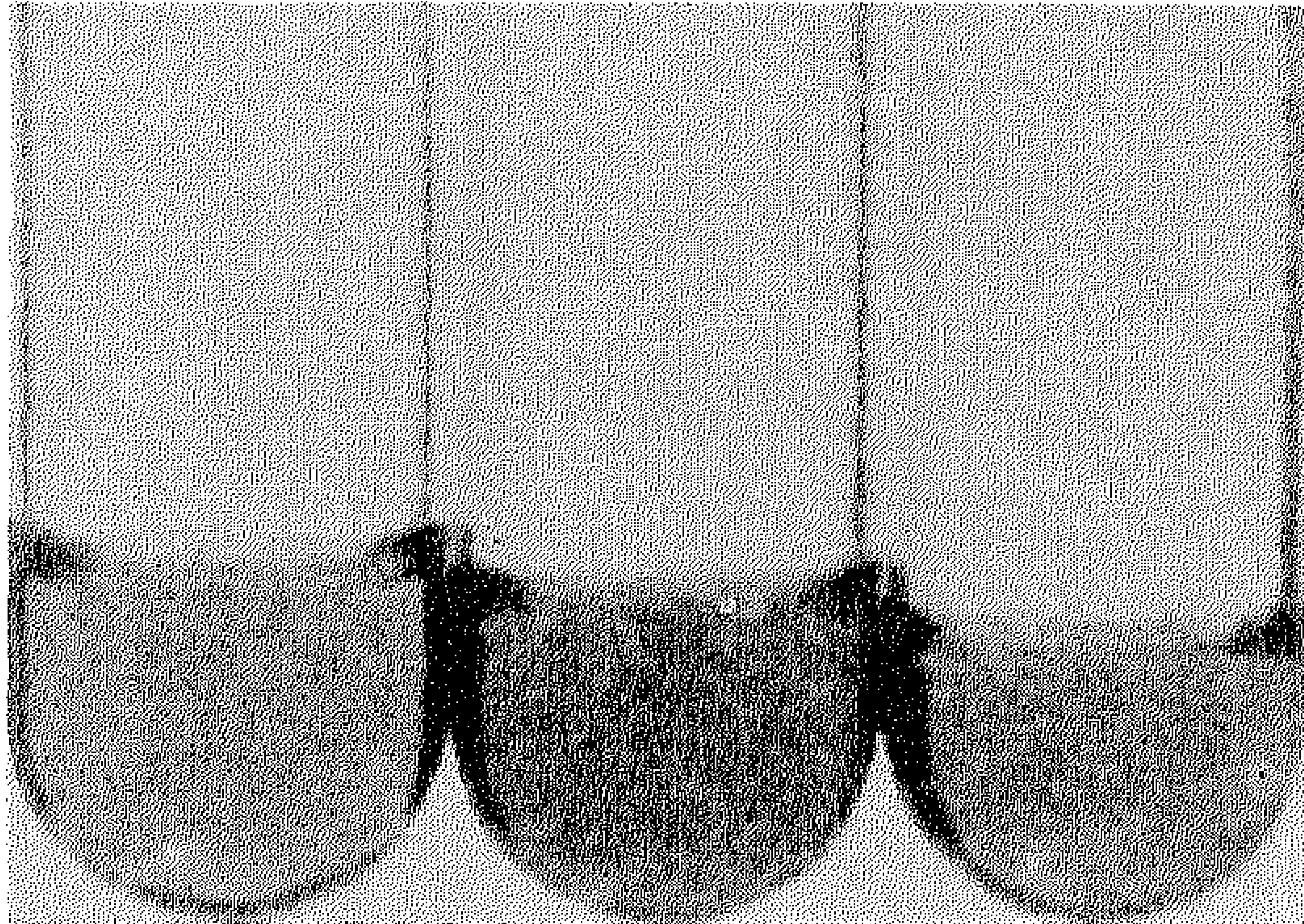
وفى الطبعة السابعة من مرجع بيرجى قسمت البكتيرات والتى وضعت فى صف Schizomycetes إلى عشرة رتب كل رتبة قسـمت إلـى عـائلات وكـل عائلة إلى أجناس – وفى العائلات الكبيرة تم تقسيمها إلى قبائل – وقد كـان هـذا نظام مرتـب ومريـح – إلا أن الأسـس التـى صنفـت عليهـا الرتـب لـم تكـن ذات مدلولات حقيقية حيث مـن غير المعـروف لهـا أى أرتباطـات تطوريـة . ولهـذا السبب فقد فكر مؤلف مرجع بيرجى فى طبعاتـه الثامنـة والتاسـعة إيجـاد طريقـة



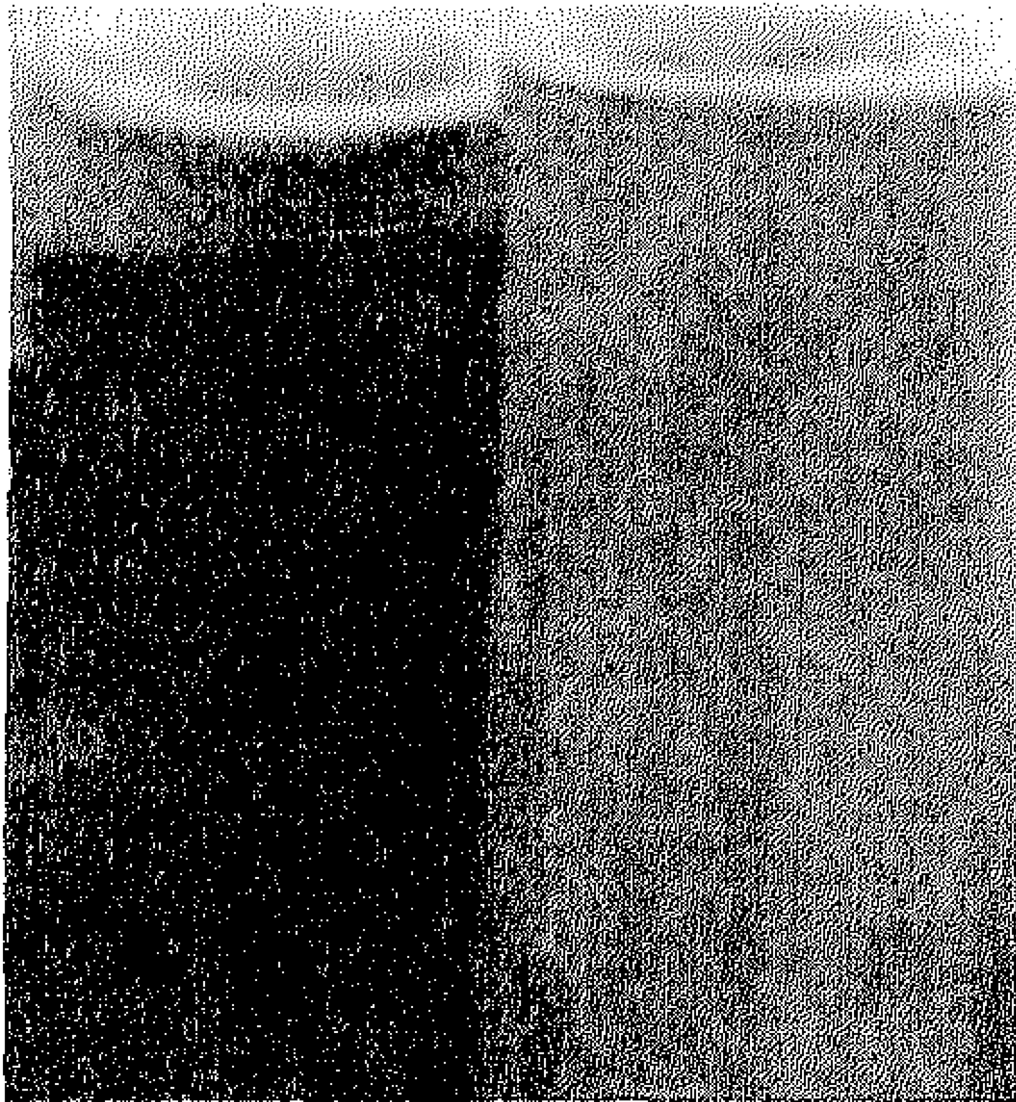
شكل ٤٢ : إختبار تحلل النشا ٠ المناطق الرائقة بجوار خط التلقيح تدل على تحلل النشا مائياً ٠



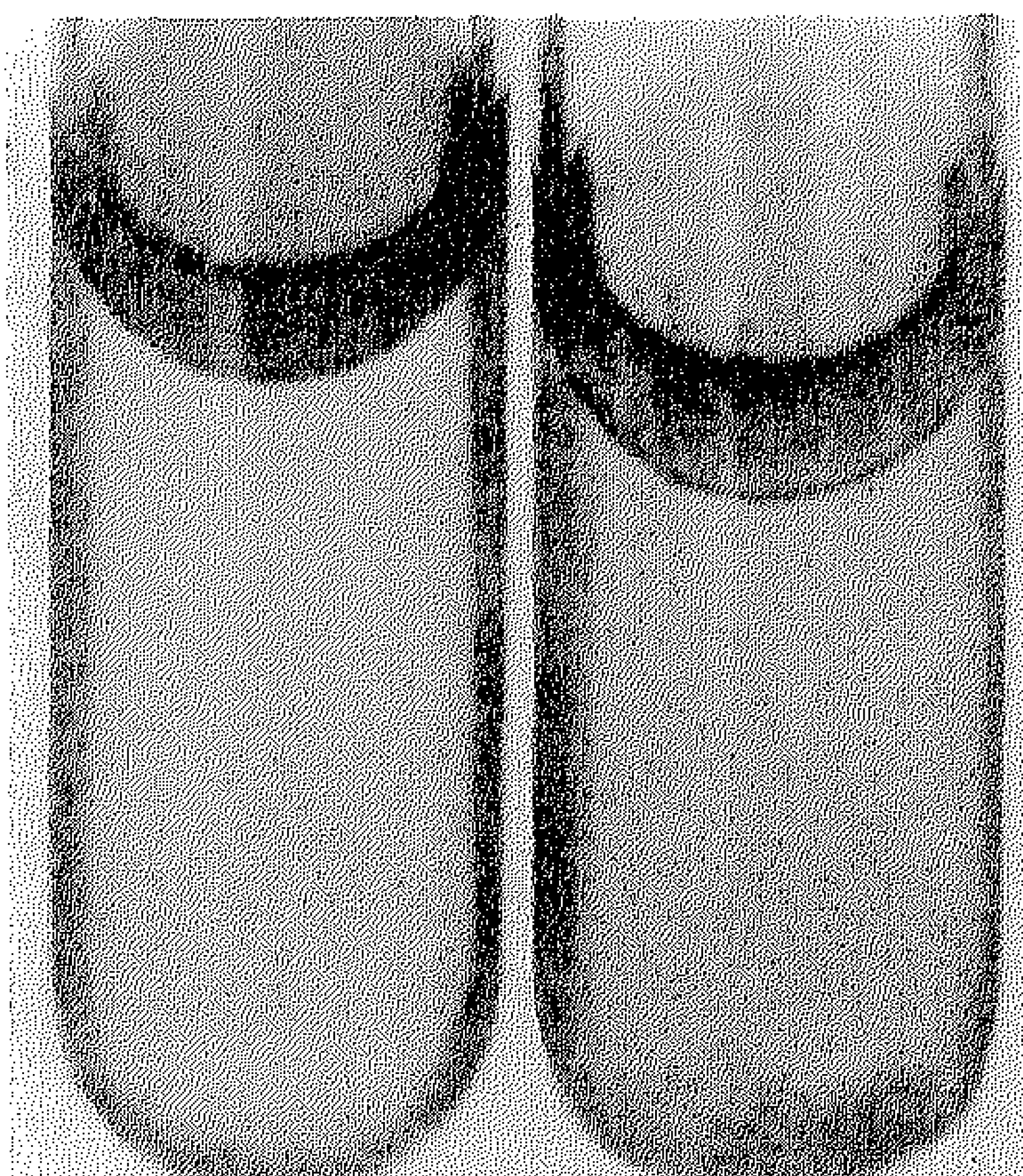
شكل ٤٣ : إختبار تحلل الكازين ٠ المناطق الرائقة حول خط التلقيح التى الى اليسار تدل على تحلل الكازين مائياً ٠



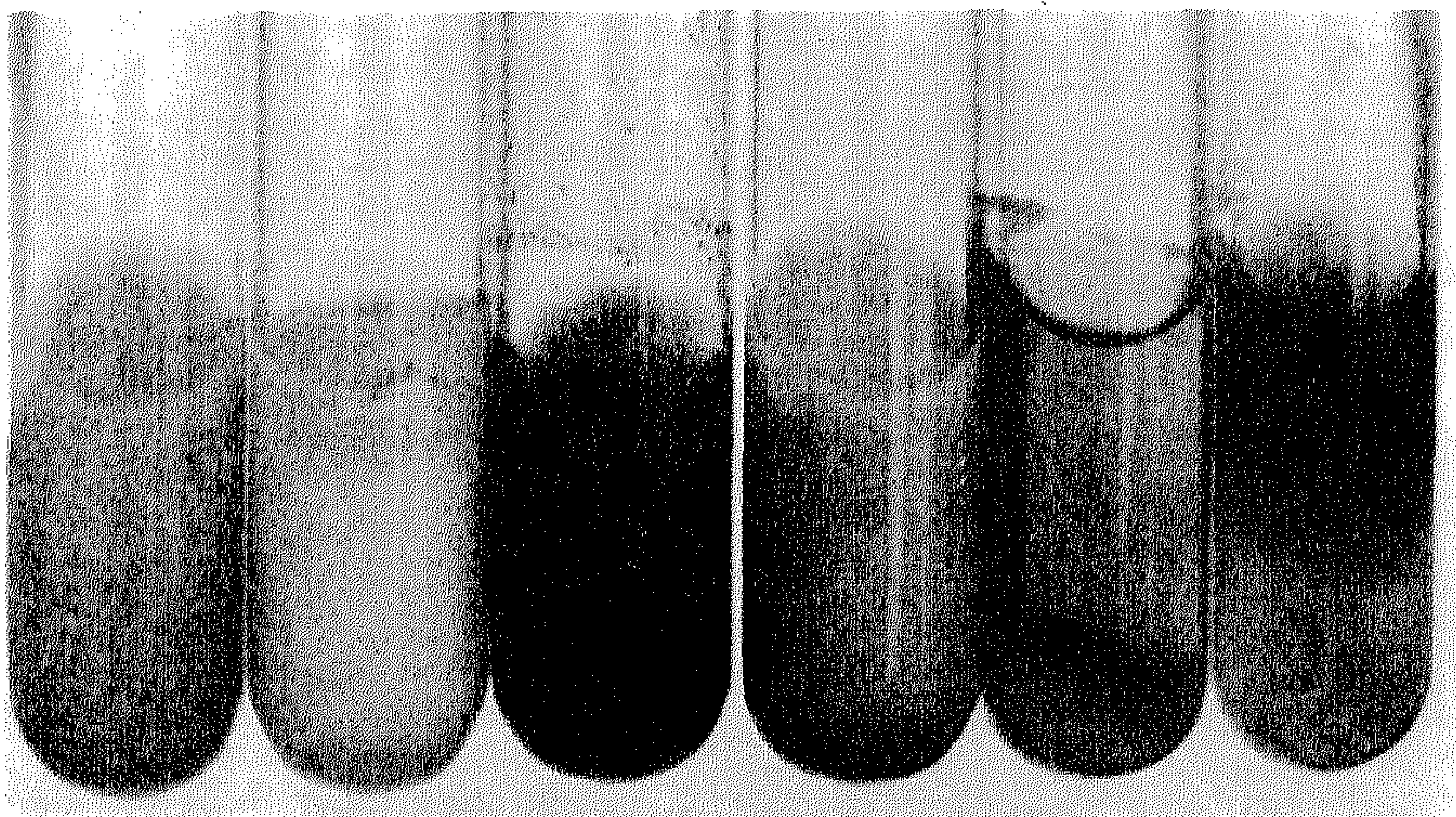
شكل ٤٤ : إختبار اليورياز (من اليسار الى اليمين) إنبوبة غير ملقحة – إنبوبة ملقحة (*Prouteus*) موجبه – إنبوبة سالبة ٠



شكل ٤٥ : إنتاج كبريتور الأيدروجين ٠ الإنبوبة على اليسار موجبه (*Prouteus*) – الإنبوبة الأخرى سالبة ٠



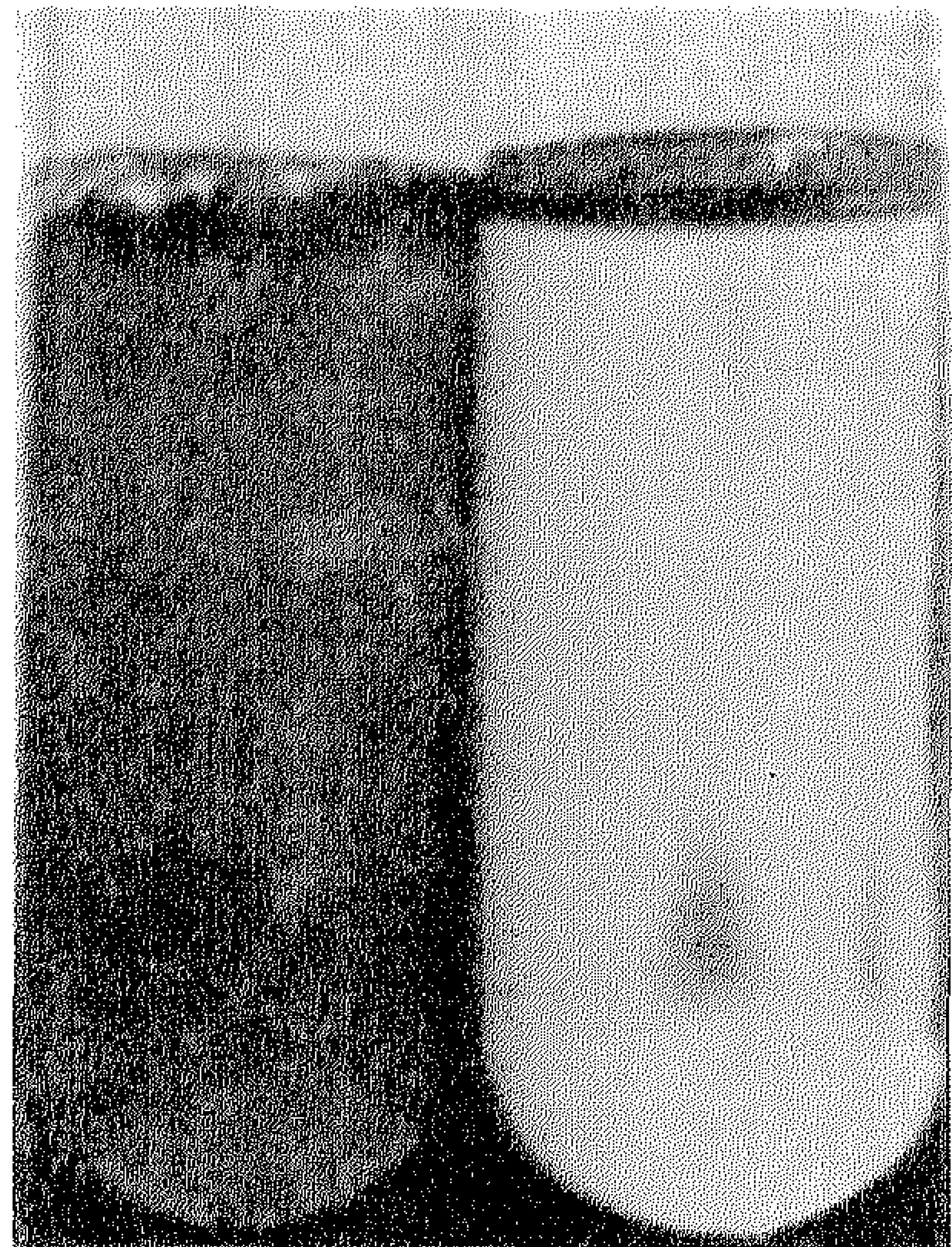
شكل ٤٦ : إختبار الإنـدول٠ الإنبوبه الى اليسار يدل على إختبار موجب نتيجة لتلقيحها بالبكتيره *E.coli* وإلى اليمين إختبار سالب (ملقحه ببكتيره أخرى لا تنتج الإندول)٠



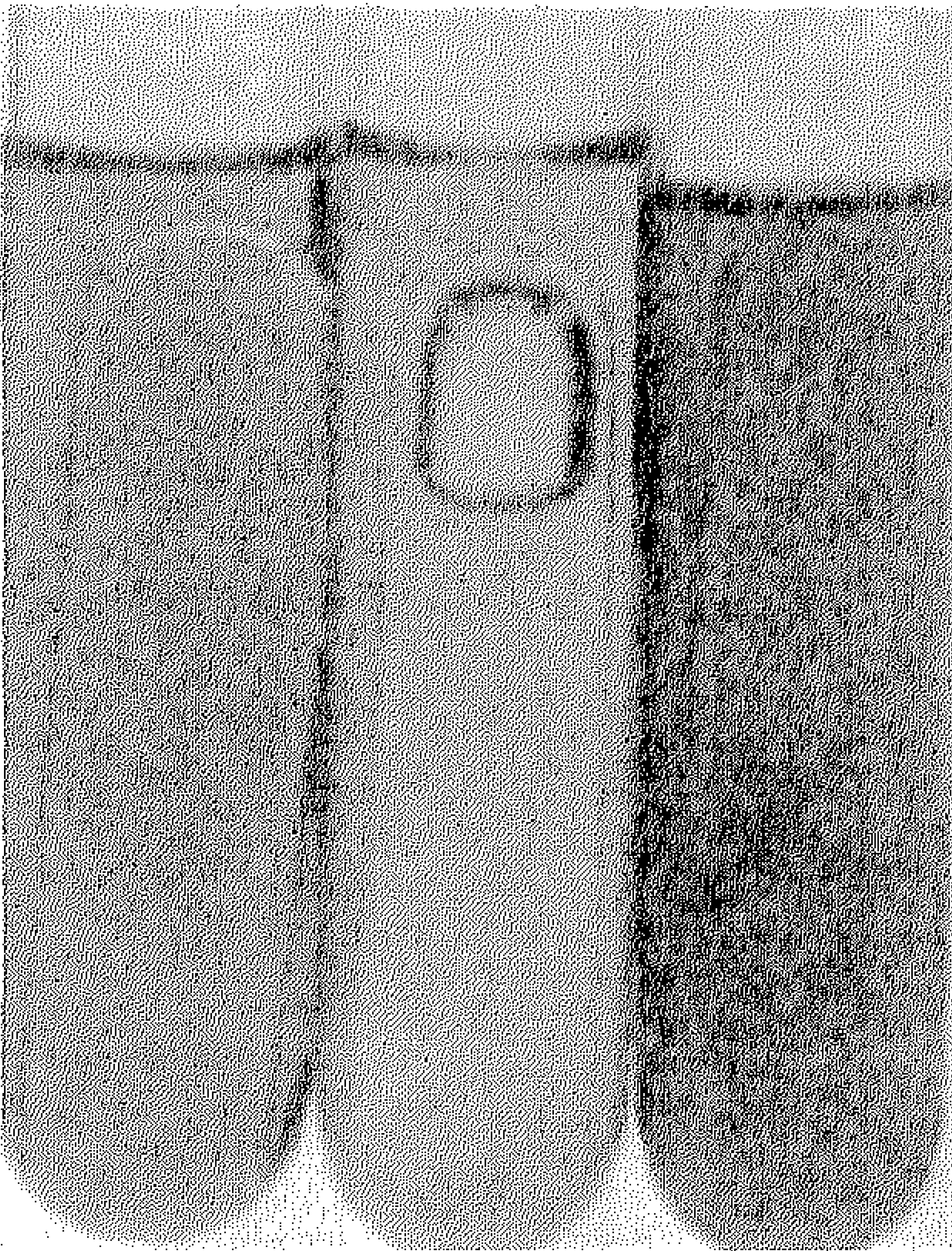
شكل ٤٧ : التفاعلات فى بيئة لبن عباد الشمس من اليسار الى اليمين تفاعل قلوى- من اليسار (١) تأثير قلوى مع بعض الببتنه٠(٢) تأثير حمضى٠(٣) تأثير قلوى شديد مع بعض الببتنه٠(٤) بيئة لبن بدون تغير٠(٥) ببتنه مع تكون خثره٠(٦) ببتنه مع تكون راسب أصفر٠



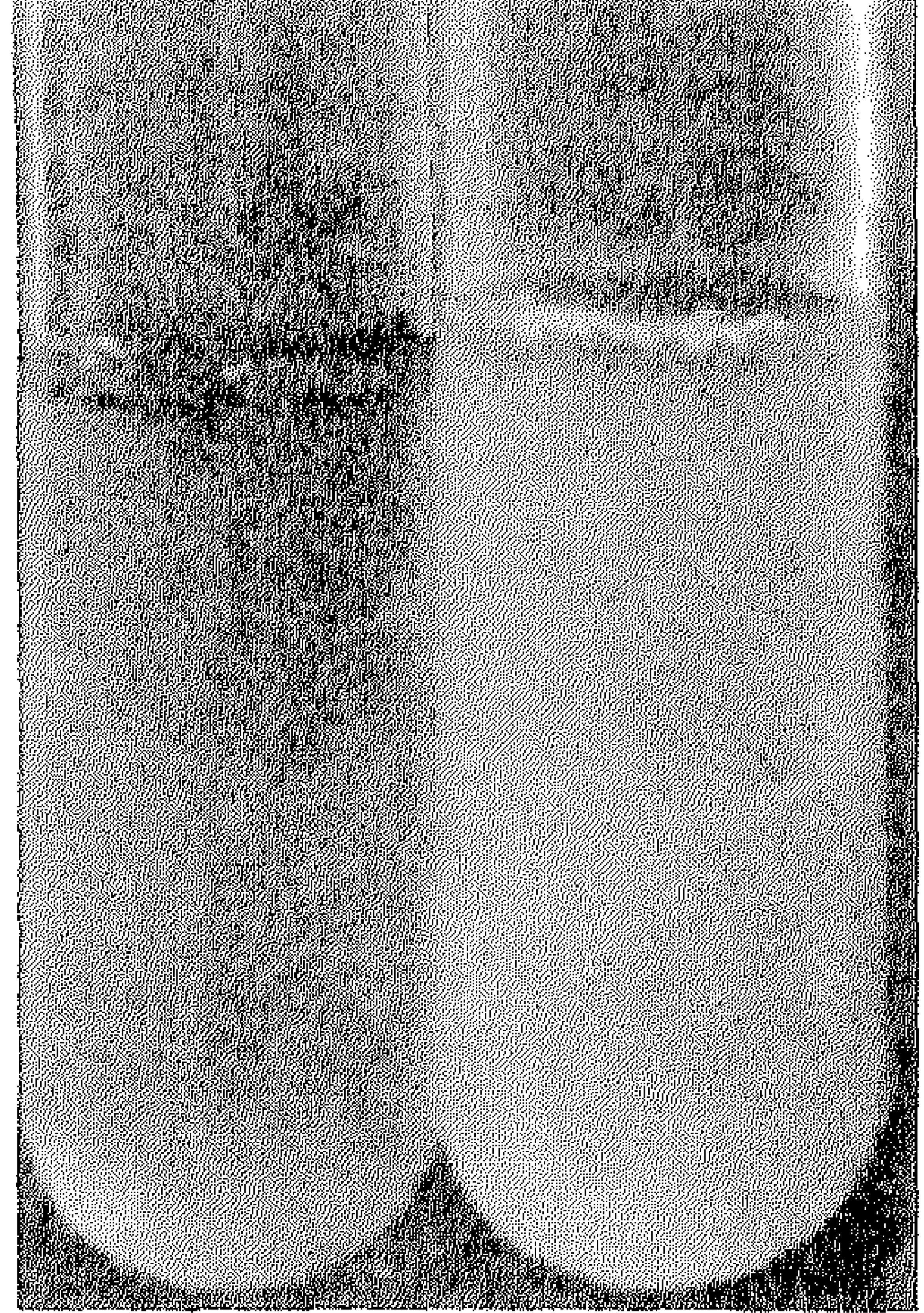
شكل ٤٨: إختبار الأوكسيداز - المستعمرات التى الى اليسار تبين إختبار موجب والتى الى اليمين تبين إختبار سالب٠



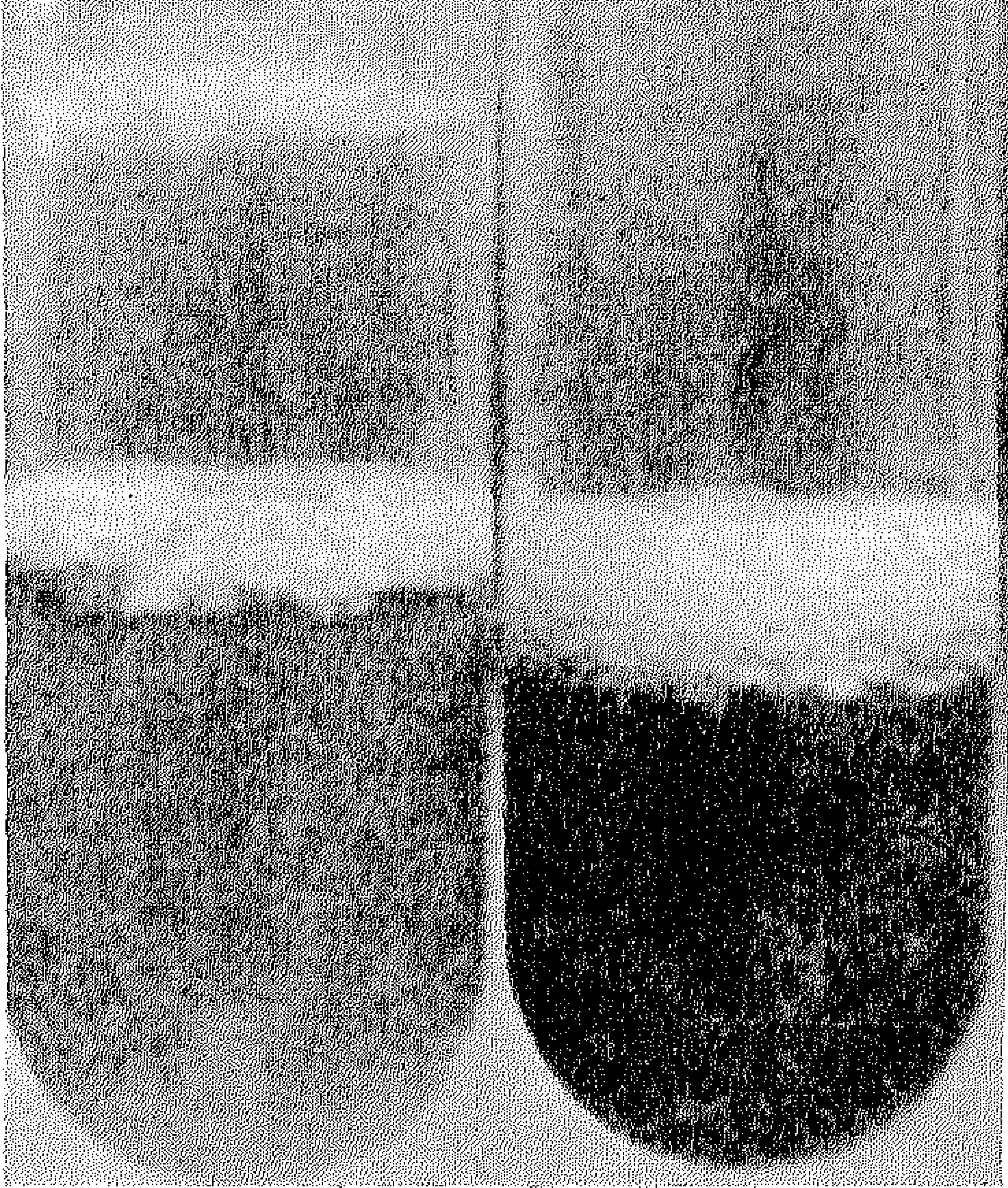
شكل ٤٩: إختبار النترات - الى اليسار إنبوبه تبين إختبار موجب والى اليمين إنبوبه تبين إختبار سالب٠



شكل ٥٠: إختبار تخمر السكريات من اليسار الى اليمين- إنبوبة غير ملقحة - إنبوبه ملقحة بالبكتيره *E.coli* (إختبار موجب) - إنبوبه ملقحة ببكتيره أخرى (إختبار سالب)٠



شكل ٥١: إختبار أحمر الميثيل – الإنبوبه الى اليسار تبين إختبار موجب والتى الى اليمين تبين إختبار سالب٠



شكل ٥٢: إختبار فوجس بروسكاور الإنبوبه الى اليسار تبين إختبار موجب والتى الى اليمين تبين إختبار سالب٠

للتقسيم سهلة وميسرة دون أن يكون لها علاقات تطورية وبذلك فقد قاموا بتقسيم البكتيرات إلى تسعة عشر جزء Part ونتيجة لذلك فأن معظم الرتب العشرة فى الطبعة السابعة قد أسقطت فى حين أن بعض الرتب مثل , Actinomycetes Myxobacteriales , Mycoplasmatales قد أبقى عليها- كما أسقطت أيضاً بعض العائلات وأدخل بعض عائلات أخرى جديدة :

فالجزء الأول أحتوى على البكتيرات الممثلة للضوء Phototrophic

الجزء الثانى أحتوى على البكتيرات المنزلقة Gliding

الجزء الثالث أحتوى على البكتيرات المغلفة Sheathed وهكذا ....

ومن المسلم به أنه بعد أن يحصل الدارس على معلومات عن صفات الكائن المورفولوجية والفسيولوجية فأنه من الممكن التعرف على إنتسابه لأى من الأجزاء التسعة عشر - وهناك عدة طرق تستعمل للتعرف على الجنس وهذه الأجزاء التسعة عشر . فيمكن للدارس أن يتتبع المفتاح المذكور فى المرجع من صفحاته الأولى أو أستعمال ما يعرف Skerman's Key والمفتاح المذكور فى صفحتى ١٩،١٨ من مرجع بيرجى يعتمد على الأحتياجات الغذائية للكائن ويجب أن يكون الباحث على المام بما تعنيه المصطلحات التالية :- Phototroph (أى الكائن الذى يعتمد على الضوء كمصدر وحيد للطاقة)، Chemotroph (الكائن الذى يعتمد على التفاعلات الكيمائية للحصول على الطاقة)، Chemolethotroph (الكائن الذى يستعمل ثانى أكسيد الكربون كمصدر رئيسى للكربون ويحصل على الطاقة من أكسدة المواد العضوية)، Chemo-organotroph (الكائن الذى يستعمل المواد العضوية كالجلوكوز والأحماض الأمينية كمصدر للكربون). وفى معظم الكائنات يكون مصدر الكربون هو نفس مصدر الطاقة والأخيرة تعرف Chemoheterotroph وهذا المفتاح يقود إلى التعرف على الجزء الذى ينتمى إليه الكائن المجهول .

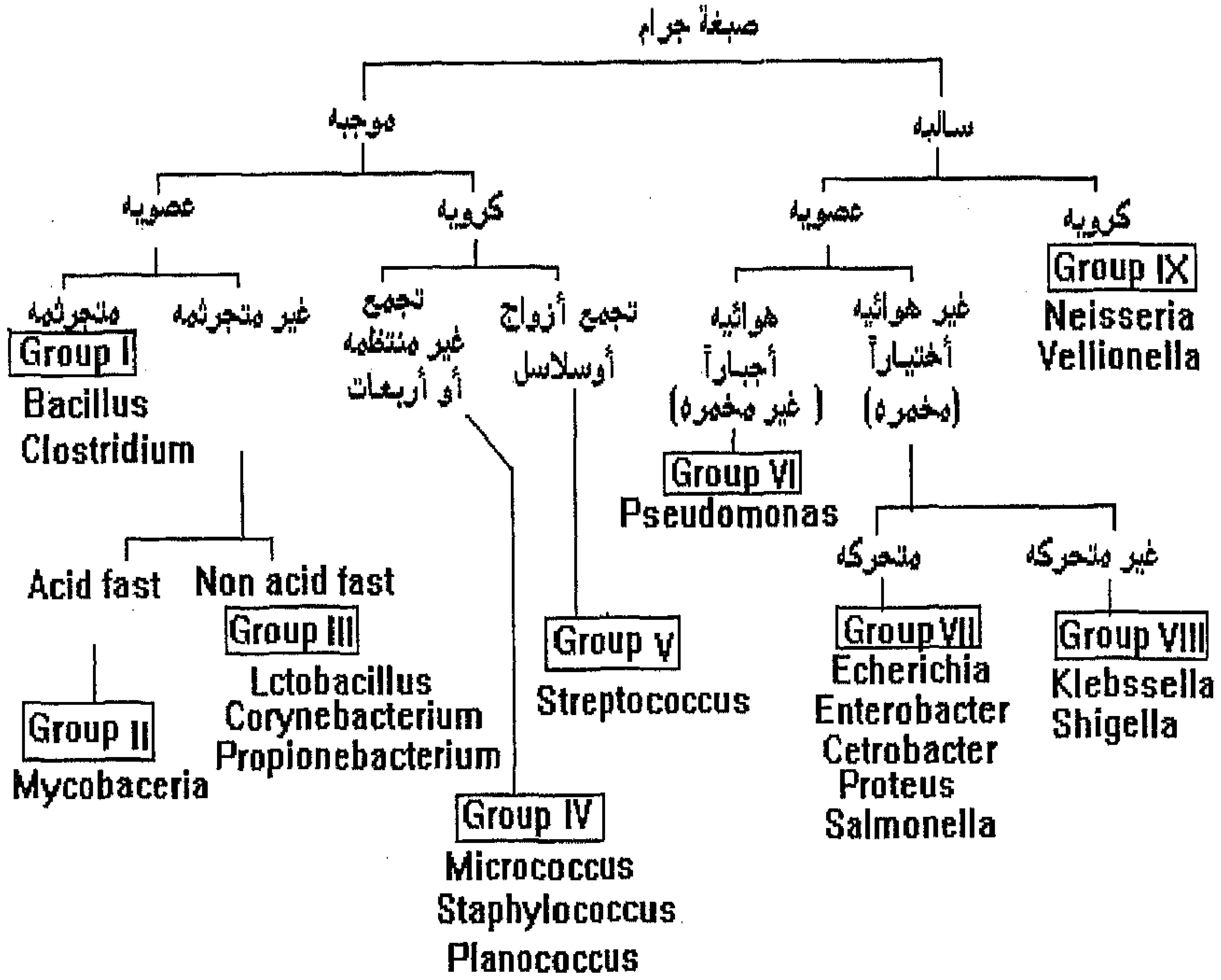
ويجب أيضا أن تعرف طريقة التعرف على تحت الاقسام Subdivision.
وحيث أن كل جزء Part يختلف عن الآخر فى طريقة تقسيمه إلى وحدات أصغر . فبعض الأجزاء مثل الجزء الثانى يحتوى على رتب وعائلات وأجناس والأجزاء الأخرى مثل الجزء الرابع تحتوى فقط على أجناس – وللتفرقة بين الأجناس يتطلب أجراء أختبارات أضافية .

مفتاح سكيرمان Skerman's Key

طريق آخر للتعرف على الجنس هو أستعمال مفتاح سكيرمان وهذا المفتاح يعطى نتائج جيدة إذا ما توفرت الصفات المورفولوجية والفسيولوجية للكائن المجهول ،هذا وغياب أدنى صفة قد تؤثر تأثيراً كبيراً على النتائج وتؤخر التعرف على الجنس .

طرق التفريق Separation outlin procedure

وبالرغم من أن هذه الطريقة مبنية على الصفات المدرجة فى مرجع بيرجى إلا أنه أكثر دقة وشمولا – فهى تشمل معظم الأجناس الشهيرة .



التعرف على الأجناس :

بالنظر إلى الشكل السابق تبين لنا لماذا نبدأ بالصفات المورفولوجية، فنحن نرغب أولاً التعرف على تفاعل صبغة جرام ، وهل الكائن كروى أم عصوى وما هو نوع التجمع – وهل الكائن متجرثم أوغير متجرثم ، وإذا كان الكائن المجهول موجب لجرام ولا يكون جراثيم نود أن نعلم هل الكائن موجب للصبغ المقاوم للأحماض أم لا، كما نود أن نعرف هل هو متحرك أو غير متحرك وبالأستمرار فى البحث نجد أنه لزاماً علينا التعرف على الصفات المزرعية وبهذا يمكننا التعرف على واحد من التسعة مجاميع الموجودة فى الشكل السابق والمشار إليها بالأرقام الرومانية [I - IX] ٠

وإذا أريد التفرقة بين الأجناس فما علينا إلا أن تدرس الصفات الفسيولوجية.

التعرف على الأنواع :

بعد أن تتعرف على الجنس فمن الضرورى التعرف على النوع – فإذا كان الجنس يحتوى علىواحد اواثنين من الأنواع فإن الأختيار يكون بسيط – إما إذا كان الجنس يحتوى على عديد من الأنــواع مثل الأجناس , *Mycobacteriun* *Bacillus , Pseudomonas* فإن التعرف على النوع يقتضى المزيد من الدراسات الفسيولوجية والسيرولوجية والحيوية – كماهو موضح بلوحة التعرف الآتية

لوحة التعرف على نوع البكتيره

أسم الباحث.................. مصدر العزل ....

تاريخ العزل .... رقم العزل ....

الشكل الظاهرى للخلايا الخضرية النامية على بيئة.....على... م° بعد..... يوم

شكل وتجمع الخلايا الخضرية .... حجم الخلايا ....

وجود أو غياب الجراثيم الداخلية ...... حجم وموضع الجراثيم ....

أختبار الحركة .... الصبغ بطريقة جرام ....

صبغ الأسواط .... الصبغ المقاوم للأحماض ....

شكل المستعمرات النامية على بيئة...... على ..... م° بعد .... يوم

الشكل .... الإرتفاع .... الحافة ....

السطح .... الصفات الضوئية ....

النموعلى الآجار المائل على بيئة .... على ..... م° بعد .... يوم

كمية النمو .... الشكل .... القوام ....

تكوين الصبغة .... الرائحة ....

النمو فى بيئة المرق المغذى على .... م° بعد ....يوم

النمو السطحى .... نمو تحت السطح ....

الراسب .... الكمية ....

تخمر المركبات الكربونية فى بيئة ....على .... م°

سكريات أحادية : أرابينوز .... رامنوز ..... زيلوز .... جلوكوز ......

فركتوز ..... جالاكتوز .... مانوز ......

سكريات ثنائية : لاكتوز ..... سكروز ......مالتوز ....

عديدة التسكر : رافينوز....... نشا...... دكسترين ..... جليكوجين ....

كحولات : جليسرين .... مانيتول.......سوربيتول ....

جلوكوسيدات : ساليسين .... Aesculin ....

علاقة النمو بالأكسجين الجوى ...... أختبار الكاتاليز ...... أختزال النترات .... أختبار الأندول ......أنتاج كبريتور الإيدروجين .... تحلل الجيلاتين ......تحلل اليوريا .... تحلل النشا ...... أختبار فوكس بروسكاور وأحمر الميثيل .... النمو فى بيئة لبن عباد الشمس ....

درجة الحرارة المثلى للنمو......... م° درجة الـ pH المثلى للنمو........

درجة الحرارة الصغرى .... م° درجة الـpH الصغرى ....

درجة الحرارة القصوى .... م° درجة الـpH القصوى ....

العلاقة الحيوية : ممرضة للأنسان .....ممرضة للحيوان ...... ممرضة للنبات ....مترممة .... ذاتية التغذية....... علاقات أخرى ....

أختبارات أخرى

التطفر Mutagensis

إن الأتجاه التجريبى نحو دراسة الوراثة بالبكتيرات كان دائماً موجهاً الى دراسة قدرة البكتيرات على التطفر ، وذلك للتعرف على منشأ الطفرات ومسبباتها وتأثيرها على المجاميع البكتيرية .

ومن أهم النتائج التى أسفرت عنها هذه الدراسه إظهار أن التصنيفات الوراثية التى تحدث للخلايا البكتيرية ترجع إلى التطفر، والطفرات هى عبارة عن تغييرات تلقائية غير موجهة قد تحدث فى المصممات (المحددات) النووية للصفات الوراثية . وتعتبر الطفرة حدث نادر وتظهر غالبا على معدل يتراوح بين ١×١٠^{-٤} إلى ١×١٠^{-١٠} لكل خلية بكتيرية لكل جيل. وهذا يعنى أن خلية واحدة من كل ١٠٠٠٠ خلية أو خلية واحدة من كل ١٠بليون خلية تكون عرضة للتطفر.

وهناك أنواع كثيرة من الطفرات منها الطفرات المقاومة للفيرس البكتيرى أو المقاومة للمضادات الحيوية أو الإشعاعات الضارة أو الطفرات الكيموحيوية والتلوينية والطفرات المختلفة فى القدرة المرضية ، أو تلك التى تؤثر على الشكل الظاهرى للمستعمرات فى معظم الأنواع البكتيرية (ناعمة (S)Smooth خشنة (R)Rough ومخاطية (M)Mucoid) .

ويفضل فى مثل هذه الدراسات الوراثية التأكد من نقاء المزارع الطفرية المستعملة وذلك بعزل خلية واحدة فردية Single cell isolation ويجرى ذلك بالأستعانة بالميكروسكوب المجهز بأجهزة خاصة بالميكرومانيبيولاتور

Micromanipulators غير إنه توجد طريقة ميكروسكوبية لا تعتمد على أجهزة خاصة لعزل الخلايا الفردية قد أتبعها De Vay and Schnathorst سنة ١٩٦٣ وتتم هذه الطريقة بأتباع الخطوات الآتية :

التمرين الثامن والستون

١- نعلم حواف شريحة بقلم شمع .

٢- يفرد ٥, - ٠ ,١ مل من زيت البارافين (المعقم) فوق سطح الشريحة فى صورة طبقة رقيقة . (الشمع الموجود على حواف الشريحة يمنع الزيت من التساقط من على سطح الشريحة) .

٣- حضر معلق مخفف جداً من المزرعة(١, مل يخفف مرتين أوثلاث مرات فى ١٠ مل ماء معقم) . واسحب كميه بسيطه منه بواسطة انبوبه شعريه معقمه بعد أن توصل بأنبوبه من المطاط يسحب منها المعلق ٠ .

٤- بواسطة الأنبوبة الشعرية الدقيقة إدفع فقاقيع صغيرة (٥٠ ميكروليتر) Micro-bubbles إلى طبقة زيت البارافين . وتلاحظ هذه العملية باستعمال شيئيات ذات تكبير بسيط (٥ ,٣ أو ٥ X) .

٥- تفحص الفقاقيع الصغيرة باستعمال شيئيات تكبيرها ٤٠ X .

٦- الفقاقيع التى تحتوى على خلايا مفردة تسحب بواسطة أنبوبة شعرية اخرى معقمة ثم تفرغ على سطح بيئة مناسبة لزرع البكتيرات . عادة يسحب بعض من الزيت مع النقطة ، لذلك بفضل أن تخطط النقطة الصغيرة المتساقطه على سطح الآجار .

٧- فى خلال ٣-٤ أيام ستظهر مستعمرة صغيرة Micro colony على سطح الآجارناشئة عن خلية مفردة .

عزل الطفرات المختلفة فى صفاتها المزرعية :

قد يشاهد بالمزرعة ذات المستعمرات المتشابهة أختلاف فى واحد أو أكثر من هذه المستعمرات فى المظهر العام المميز للمزرعة . وقد يظن كثير من الفاحصين أن مثل هذه المستعمرات المختلفة ترجع إلى تلوث المزرعة واختلاطها بغيرها . ولكن فى كثير من الأحيان تكون هذه المستعمرات المختلفة فى صفاتها المزرعية نتيجة للتطفر . والتمرين التالى يهدف إلى التأكد من ثبات الشكل الظاهرى لمستعمرات نوع معين من البكتيرات .

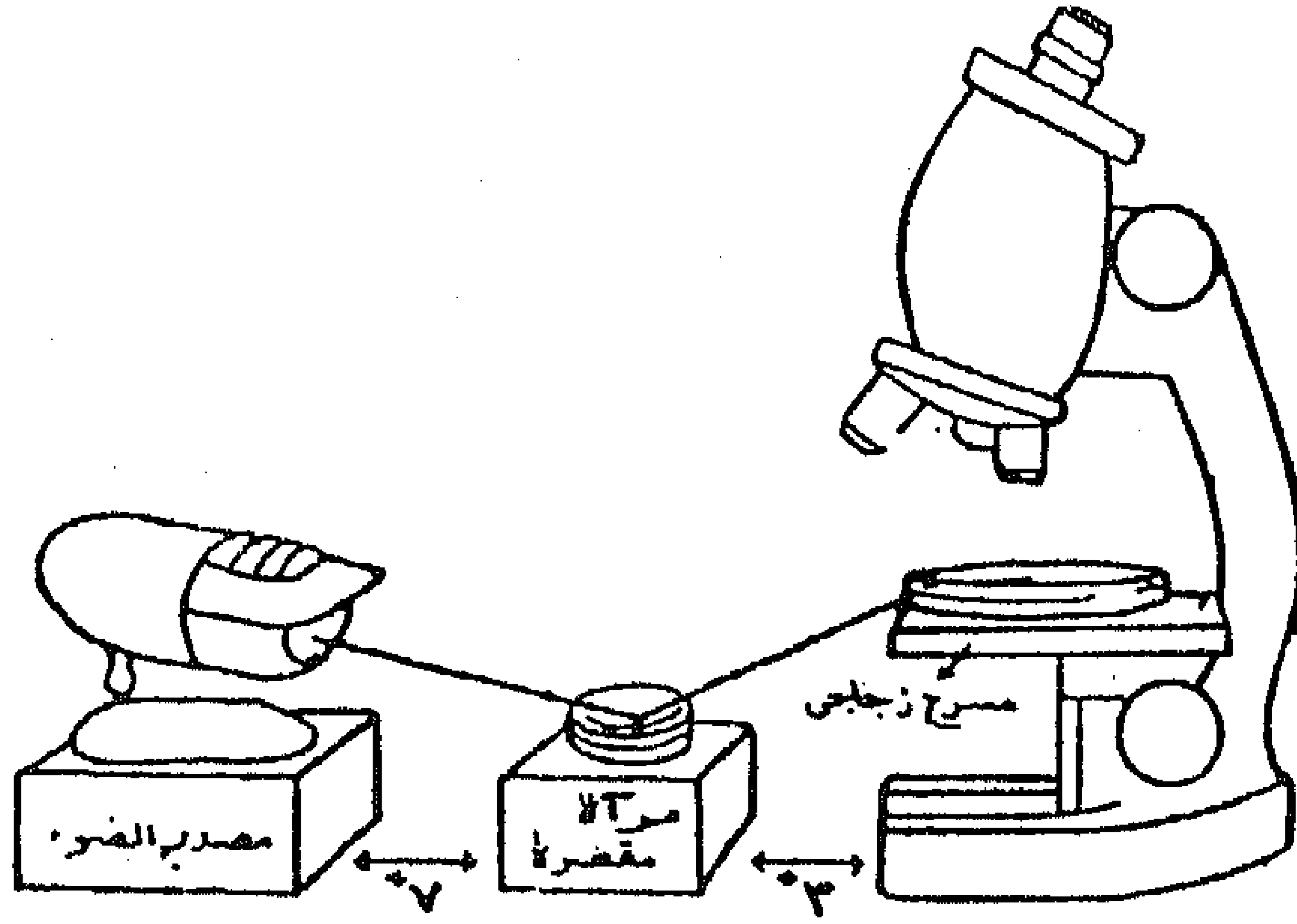
التمرين التاسع والستون

١- صب أطباق ببيئة آجار السكروز(آجار مغذى + ٥٪ سكروز)

٢- لقح خمسة أطباق منها بمعلق مخفف من مزرعة لم يسبق تجديدها وخمس أخرى بمعلق من مزرعة قديمة سبق تجديدهاعدة مرات من البكتيره *Erwinia amylovora* وذلك بطريقة التخطيط البسيط .

٣- ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٧٢ ساعة .

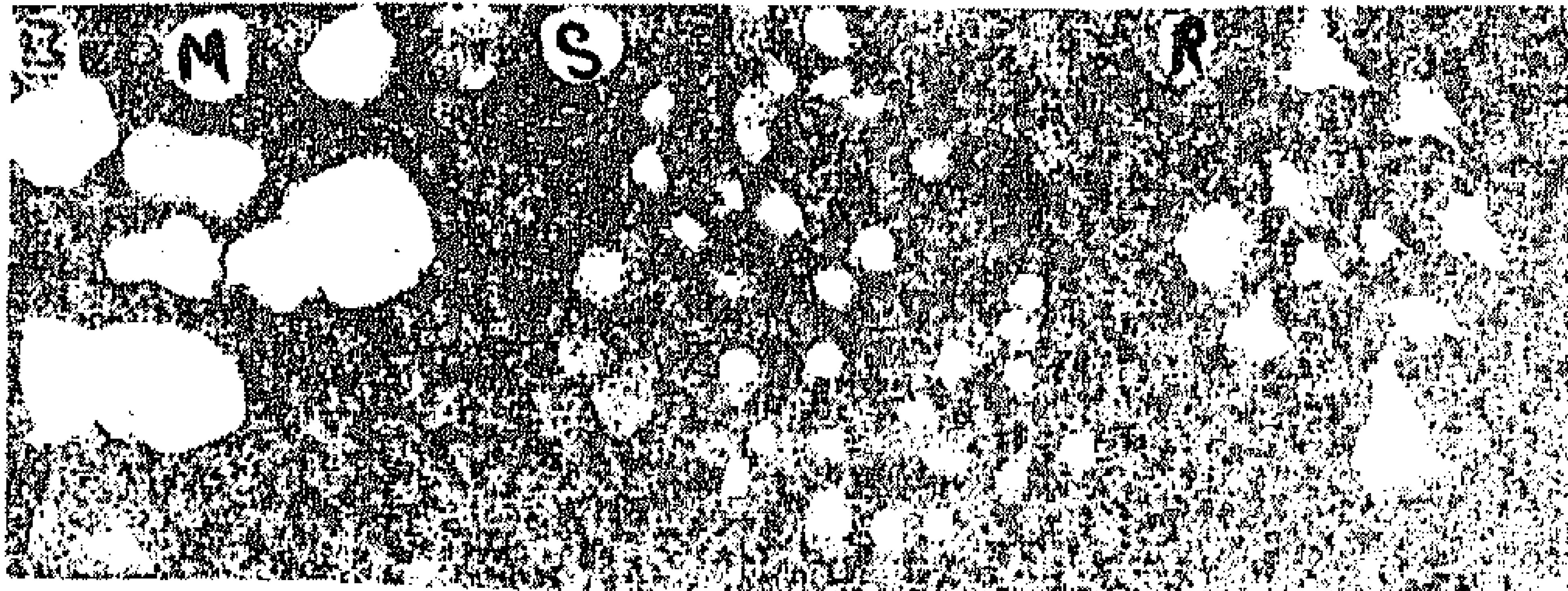
٤- إفحص المستعمرات النامية فى الأطباق بالعين المجردة ثم باستعمال مجهرتشريح له زوج من العدسات العينية Binocular dissecting microscope مع جعل الأضاءة تنفذ خلال المستعمرات بطريقة مائلة Obliquely transmitted كما هو مبين (بشكل ٥٣) .



شكل ٥٣ : كيفية الحصول على الضوء المائل لغرض فحص المستعمرات البكتيرية ٠

٥- صف المستعمرات الناتجة فى كل حالة،لاحظ أن مستعمرات المزرعة التى لم يسبق تجديدها دائرية ، محدبة لامعة، زبدية القوام، ويسمى هذا النوع من المستعمرات بالناعمة smooth(s)، أما المستعمرات الناتجة عن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات فأنه علاوة على النوع السابق من المستعمرات يظهر نوعين آخرين (أ) مستعمرات خشنة Rough(R) وتتميز بأنها ذات حافة غير منتظمة وذات مظهر حبيبى مجعد جاف .

(ب) مستعمرات مخاطية Mucoid(M) تتميز بأنها دائرية شديدة التحدب لزجة لامعة (شكل ٥٤) .



شكل٥٤: مستعمرات ناعمه(S) وخشنه (R) ومخاطيه(M) من البكتيره *Erwinia amylovora* كما تشاهد بالعين المجردة٠

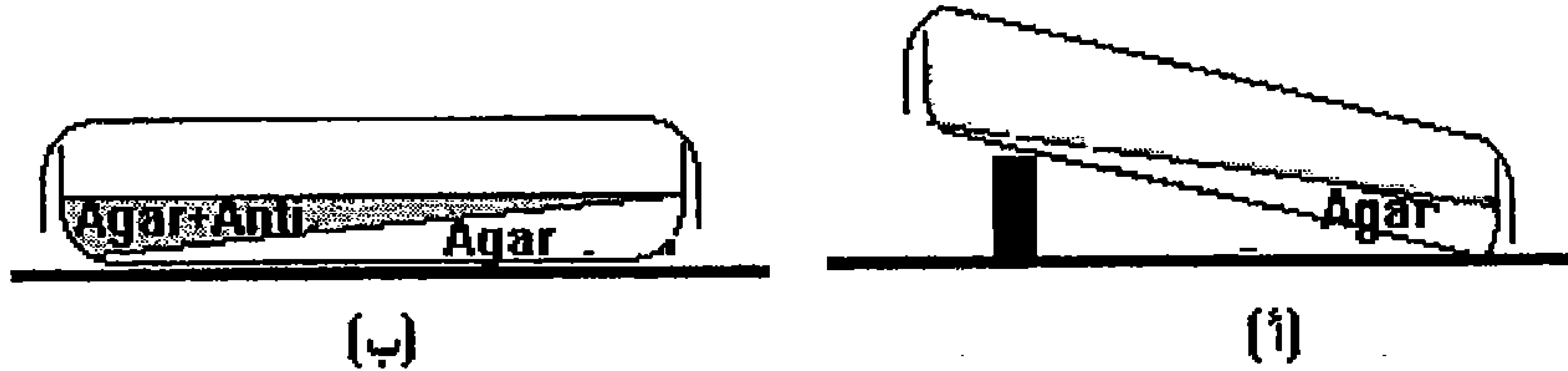
عزل طفرات مقاومة للمضادات الحيوية :

تسبب الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية مشــاكل خطـيرة فـى عـلاج الأمراض الميكروبية بواسطة المضادات الحيوية.وغالبا ما يؤخذ إحتمال حدوثهـا فى الأعتبار عند تحديد العـلاج . وهنـاك عدة طـرق لعزل الطفـرات المقاومـة للمضادات الحيوية من مزارع البكتيرات أو مـن العينـات التـى تعـزل مـن جسـم الأنسـان أو الحيـوان المصـاب ، نذكـر منهـا طريقـة الطبــق المتــدرج Gradient plate technique وخطوات هذه الطريقة تتلخص فيما يلى :

التمرين السبعون

١- صب ١٠مل من بيئة الاجار المغذى المسال (٤٥°م) .

٢- يترك الآجار ليتصلـب بـالطبق وهـو فـى وضـع مـائل بوضـع أحـد جانبى الطبق على قطعة من الخشب حتى يكون هذا الجانب مرتفعا عـن الجـانب الآخر أثناء تصلب الآجار (شكل ٥٥ - أ) .



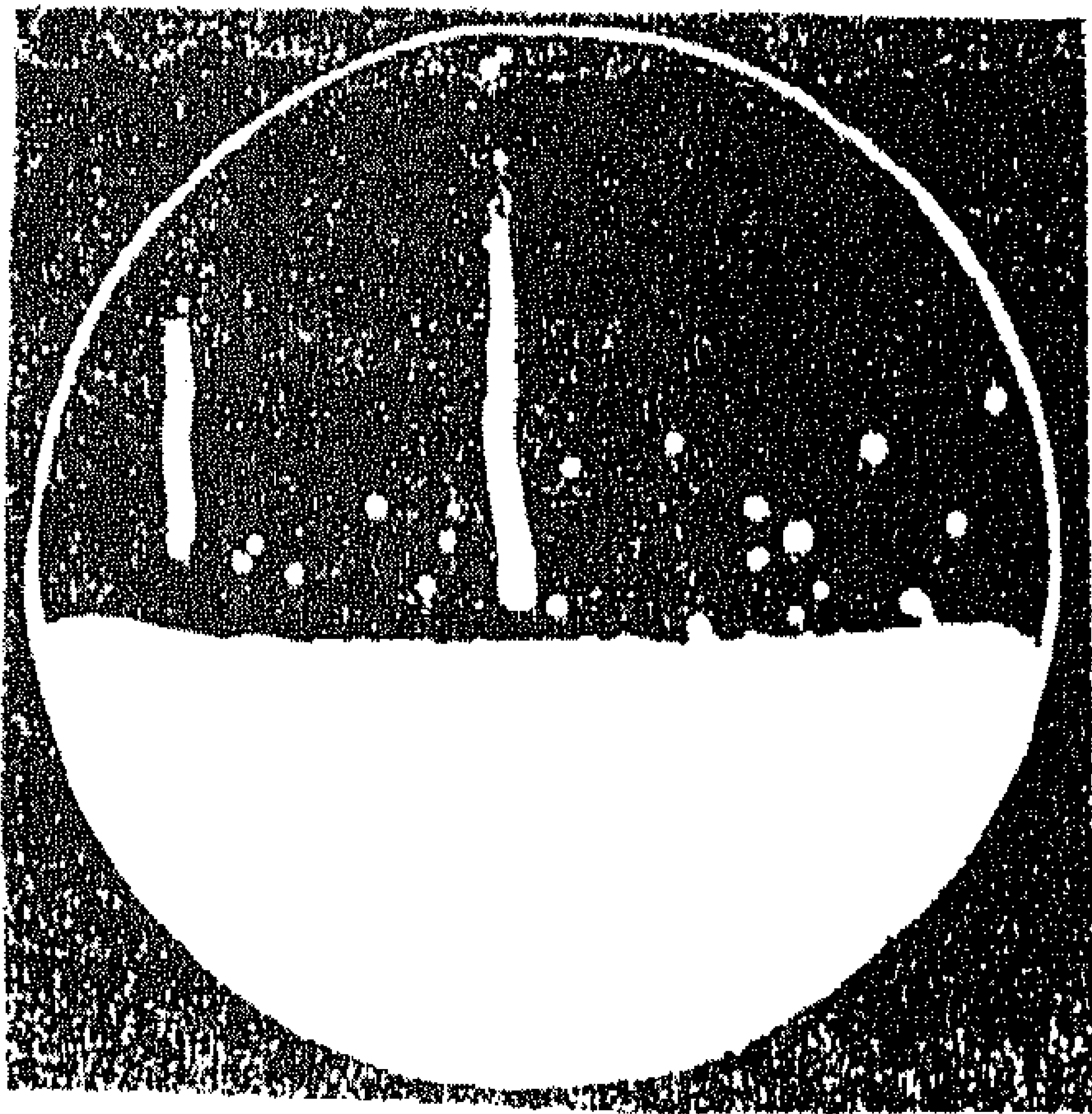
شكل ٥٥ : خطوات تحضير بيئة ذات التركيز المتدرج

٣- لقح كمية ١٠ مل من بيئة الآجار المغذى المسالة (٥٠°م) بكمية١, مل مزرعة البكتيره *E.coli* النامية فى المرق المغذى لمـدة ٢٤سـاعة والمضـاف إليها ستربتوميسين بنسبة ٤٠٠ ميكروجرام/مل من البيئة (يلاحظ إضافة المضـاد

الحيوى إلى البيئة وهى على درجة ٥٠°م حتى لا تتأثر فاعليــة المضـاد الحيـوى مـن الحـرارة المرتفعـة) ثـم يصـب الاجـار الملقـح بنفس الطبـق وتـترك البيئــة لتتصلب بالطبق وهو فى وضع أفقى تماما (شكل ٥٥ – ب) .

٤- ضـع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ساعة ثم أفحـص ما يظهرعلى سطح الآجار من نموات . ويبين (شكل ٥٦) ما يمكن أن يلاحـظ . (حيث أن المضاد الحيوى بطبقة الآجار العلوية سوف ينتشـر إلـى طبقـة الآجـار السفلية الخالية من المضاد الحيوى وأن درجة الأنتشار سوف تؤدى إلـى تخفيـف تركيز المضاد الحيوى فـى الطبقـة العليـا . ويتوقـف التخفيـف علـى نسـبة سـمك طبقتى الآجارالعليا إلى السفلى ، لذلك فإن تركيز المضاد الحيوى سيكون متدرجاً بالطبق).

٥- فى حالة ظهـور مستعمرات مفردة بعيدا عن المنطقـة ذات النمـو المتزاحم فإن ذلك دليل على أن خلايا هذه المستعمرات المفردةمقاومة للتركيزات المرتفعة من المضاد الحيوى.وللتأكد من ذلك يفرد نمو بعـض هـذه المسـتعمرات تجاه التركيزات الأكثر أرتفاعا بالطبق ، ثم يترك الطبق بالحضان لمدة ١٨ساعة أخرى يفحص بعدها،وجود نمو مستمر على أمتداد خط الفرد يـدل علـى أن هـذه المستعمرة ناتج عن نمو طفرة مقاومة للتركيزات المرتفعة مـن المضـاد الحيـوى (شكل ٥٦) .



شكل ٥٦: نمو طفـرات مـن البكتيره *E.coli* علـى طبـــق متـدرج التركـيز من المضـــاد الحيوى.

عزل الطفرات المختلفة فى قدرتها المرضية :

باستمرار زرع البكتيره *Pseudomonas solanacaerum* (المسببة لمرض العفن البنى فى البطاطس) على البيئات الصناعية فإن ذلك يؤدى إلى إضعاف قدرتها المرضية للنبات أو إلى ضياع هذه القدرة نهائيا.ويعزى ذلك إلى أن المزرعة الأصلية ذات القدرة الممرضة المرتفعة Virulent تظهر بها طفرات غيرقادرة على إحداث المرض Avirulent وأن هذه الطفرات يزداد تعداد أفرادها فى المزرعة على حساب السلالة الأصلية لتحملها ظروف المزرعة غيرالملائمة أكثر من السلالة الأصلية الممرضة وكذلك لقدرتها على إحداث تثبيط فى نمو السلالة الممرضة.وقد تمكن كلمان Kelman فى سنة ١٩٥٤من إيجاد طريقة تسهل التمييز بين السلالات الممرضة وغيرالممرضة من هذه البكتيره بالزرع على بيئة التيترازوليم التفريقية.

ويلاحظ أن أملاح التيترازوليم Tetrazolium ذائبة فى الماء وعديمة اللون وعندما تختزل تتحول إلى مواد ملونة غير ذائبة وهى الفورمازان Formazans وعلى ذلك فإن أختزال التيترازوليم يدل على نشاط الأنزيمات المزيلة للأيدروجين Dehydrogenases وقد وجد كلمان أن السلالات الممرضة تظهر بيضاء اللون أو ذات مركز محمر وغير الممرضة تظهر بلون أحمر مع حافة شفافة .

التمرين الحادى والسبعون

١- صب أطباق من بيئة التيترازوليم التفريقية (آجار مغذى + ٢٪ جلسرين + ٠,٠٠٥ ٪ Triphenyl tetrazolium chloride) .

٢- لقح بعض من الأطباق بمعلق مخفف من مزرعة حديثة العزل من نبات مصاب ولم يسبق تجديدها ومجموعة أخرى من الأطباق من مزرعة قديمة سبق تجديدها عدة مرات من البكتيره *P. solanacearum* وذلك بطريقة التخطيط البسيط .

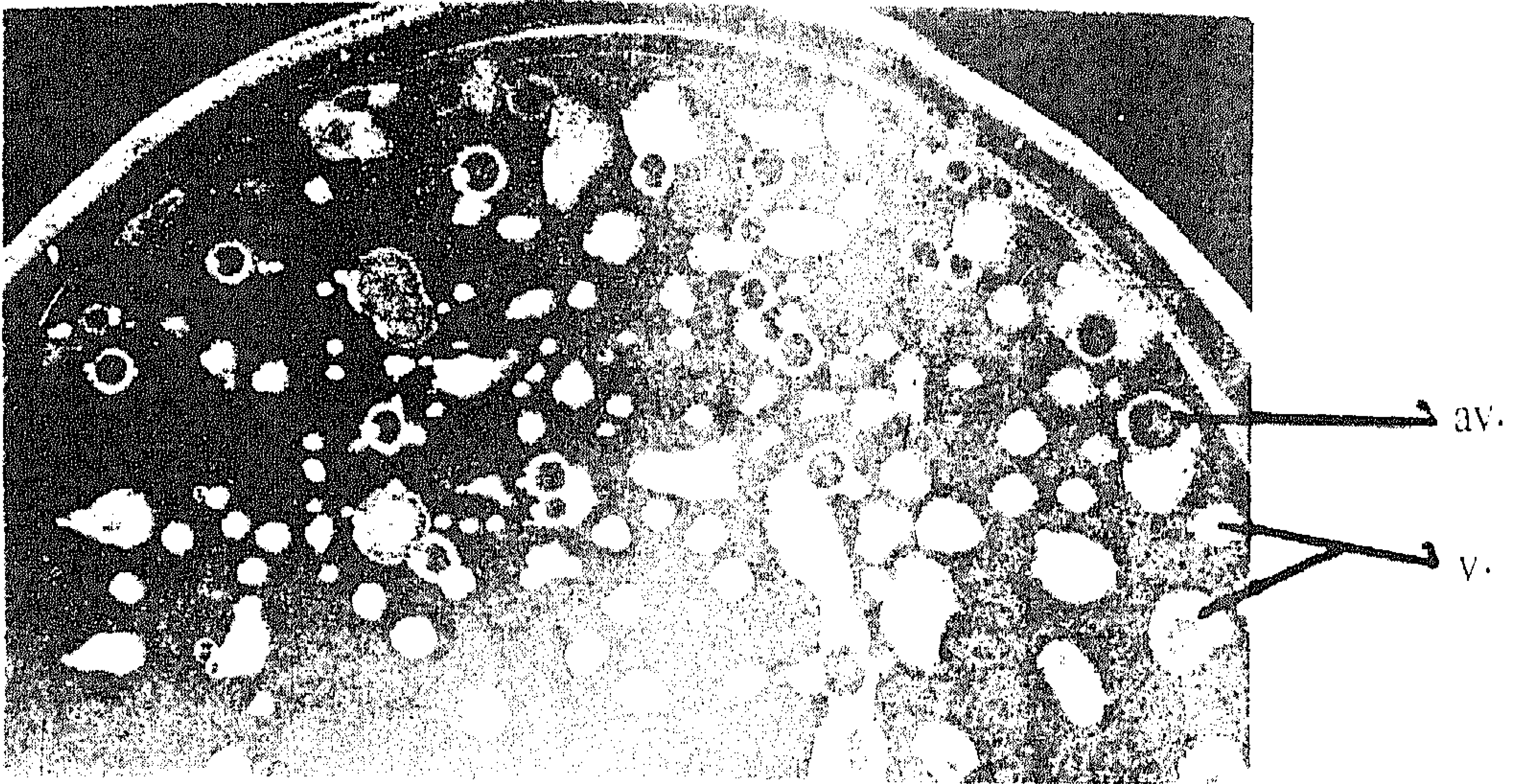
٣- ضع الأطباق فى الحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ساعة .

٤- إفحص المستعمرات النامية فى الأطباق .

٥- صف المستعمرات الناتجة فى كل حالة . لاحظ أن مستعمرات المزرعة الحديثة والتى سبق تجديدها بيضاء وغير منتظمة وسائلة Fluidal (شكل٥٧) أما المستعمرات الناتجة عن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات

فأنه يظهر علاوة على النوع السابق من المستعمرات نوع آخر من المستعمرات الطفرية يتميز بأنه مستدير وزبدى القوام ولونه أحمر غامق مع وجود حافة ضيقة شفافة (شكل ٥٧)٠

٦- إجرى عدوى صناعية على نباتات بطاطس وطماطم نامية فى تربة معقمة فى إصص معقمة . وتجرى العدوى الصناعية بوخز الساق بأبرة تشريح معقمة وعليها جزء من النمو البكتيرى . تلقح مجموعة من النباتات بلقاح من النوع الأول من المستعمرات (بيضاء) ومجموعة أخرى بلقاح من النوع الثانى من المستعمرات (حمراء) وتوخز مجموعة من النباتات بإبرة تشريح معقمة فقط وتترك للمقارنة. تترك النباتات فى الجو العادى على درجة ٢٦-٢٨°م .



شكل ٥٧ : مستعمرات من البكتير *Pseudomonas solanacearum* النامية على بيئة آجار الجليسرول المحتوية على مادة التترازوليم كلوريد. المستعمرات البيضاء أو البيضاء ذات مركز أحمر مستعمرات ممرضة Virulent . المستعمرات الحمراء غير ممرضه avirulent .

٧-نباتات الطماطم والبطاطس الملقحة بالمستعمرات البيضاء تذبل تماماً بعد خمسة وسبعة أيام على التوالى فى حين أن النباتات الملقحة بالمستعمرات الحمراء وكذلك نباتات المقارنة لم يحدث لها ذبول أو أى أعراض مرضية خلال نفس هذه المدة (شكل ٥٨) .



شكل ٥٨ :العدوى الصناعيه بواسطة البكتيرة *Pseudomonas solanacearum* لصنف البطاطس نيقولا. (A) نبات سليم غير معدى. (B) نبات معدى بمستعمرات بيضاء a highly virulent strain . (C) نبات معدى بمستعمرات بيضاء ذات مركز أحمر virulent strain . (D) نبات معدى بمستعمرات حمراء غير ممرضه avirulent .

تجارب فى البكتيريولوجيا التطبيقية

أولاً : بكتيريولوجيا الألبان

لما كان تركيب اللبن يلائم نمو الكثير من البكتيرات لذلك يجب الأهتمام بإنتاج اللبن ليصل إلى المستهلك وبه أقل كمية من الخلايا البكتيرية وخاصة الكائنات الممرضة وأول خطوات الفحص المعملى هو الحصول على عينات من اللبن ممثلة للبن المنتج .

أخذ العينة :

والعينات تكون أما من اللبن الخام الناتج بالمزرعة بمجرد إنتاجه أو بمجرد وصوله إلى المصنع أو أثناء تصنيعه أو من اللبن المعروض بالاسواق للأستهلاك. وفى كل الحالات يلزم تقليب اللبن جيداً بمقلبات خاصة والمقلب عبارة عن قرص مثقب من المعدن قطره حوالى ١٢-١٥ سم يتصل به يد من الصلب غير القابل للصدأ معقمة بطول متر واحد .

ويمكن فصل القرص عن اليد للتنظيف والتعقيم . ولكل من الأقراص والأيدى أوعية خاصة توضع بها لأجراء التعقيم .

التمرين الثانى والسبعون

١- يقلب اللبن جيداً- يراعى أستعمال مقلب لكل قسط أو حوض .

٢- تؤخذ بواسطة ماصة معقمة عينة من اللبن .

٣- توضع العينة فى زجاجة معقمة ويراعى أن لا يملئ اللبن الزجاجة حتى يسهل رجها قبل الفحص ٠

٤- تفحص العينة فى بحر ساعة من أخذها .

٥- يمكن حفظ العينات فى ثلاجة بدرجة ٤-٦°م لمدة ٦-١٢ ساعة إذا ما توفرت الثلاجات .

فحص العينات :

أ- العد القياسى بالأطباق.

التمرين الثالث والسبعون

١- نجهز عينة من اللبن الخام وأخرى من اللبن المبستر تجارياً .

٢- يعمل فى كل تخفيفات فى حالة اللبن الخام إلى 10^{-6} وفى حالة اللبن المبستر 10^{-5} .

٣- تتبع طريقة الأطباق المصبوبة مع أستعمال بيئة آجار اللبن .

٤- تحضن الأطباق على حرارة ٣٢-٣٥°م لمدة ٤٨ساعة .

٥- تعد المستعمرات .

ب- طريقة العد المجهرى.

التمرين الرابع والسبعون

١- نجرى عمل غشاء فى اللبن على شريحة نظيفة .

٢- تغمر الشريحة فى الزيلول لمدة دقيقة للتخلص من الدهن .

٣- تغمر الشريحه فى كحول ٩٥٪ للتخلص من الزيلول.

٤- تغسل الشريحه بالماء الجارى للتخلص من الكحول.

٥- تغمر الشريحه بصبغة السفرانين لمدة ١ دقيقه.

٦- تغسل الشريحه بالماء الجارى.

٧- تترك الشريحه لتجف فى الهواء الجوى ٠

٨- وضع نقطه من زيت السيدر وتفحص بالعدسة الزيتيه٠ثم يقدر عدد الخلايا فىالمليليتر الواحد فى اللبن .

جـ- أختبار أزرق المثيلين

يعتبر هذا الأختبار من أهم الأختبارات التى تجرى لتقدير نظافة اللبن فى حالة

عدم توفرالأجهزة الخاصة بالأختبارات الأخرى . والأساس فى هذا الأختبار أنه كلما زاد

ما تحتويه العينة من ميكروبات كلما قل الوقت اللازم للأختزال وزوال اللون الأزرق٠

التمرين الخامس والسبعون

١- حضر أنبوبة أختبار معقمة وأضف إليها ١مل من محلول أزرق المثيلين (تركيز ١: ١٠٠٠٠)٠

٢- أضف بسرعة ١٠مل من عينة اللبن .

٣- ضع الأنبوبة فى حمام مائى درجة حرارته ٣٥°م ويترك لمدة خمس دقائق حتى تكتسب الأنبوبة حرارة الحمام .

٤- يراعى تقليب محتويات الأنبوبة عدة مرات حتى لا تطفو القشدة على السطح على أن تعاد للحمام بعد الرج .

٥- تفحص الأنابيب بعد نصف ساعة - مع تسجيل رقم الأنبوبة التى يتم بها أختزال أزرق المثيلين بدرجة ٨٠٪ (أى أختفاء اللون الأزرق بنسبة ٨٠٪) وتترك مثل هذه الأنابيب جانبا وتحتسب لها وقت نصف ساعة .

٦- تقلب الأنابيب المتبقية ثم ترجع إلى الحمام وتفحص بعد ساعة للتعرف على ما يحدث من أختزال .

٧- تكرر العملية بعد ساعة أخرى ويسجل ما أختزل منها بنسبة ٨٠٪ ثم تترك الأنابيب كما هى ساعة أخرى وهكذا إلى أن يمر ٢٤ساعة ثم يلاحظ ما يحدث بها من تغييرات .

د- أختبارأختزال الرسازورين

من الأختبارات التى أضيفت حديثاً ويشابه الأساس فيها ذلك الخاص بأختبار أزرق المثيلين إلا أنها تتميز عليه بأمكانية تتبع أختزال الصبغة بدرجة أدق - فلون الرسازورين عند رقم الـ pH المتعادل يكون أزرق وعند أختزالها تتخذ اللون القرنفلى نتيجة لتكون مادة ريزوروفين _ ويحدث اللون بالتدريج من البنفسجى ثم اللافندر ثم القرنفلى .

التمرين السادس والسبعون

١- يوضع فى أنبوبة معقمة ١مل من محلول الرسازورين .

٢- يضاف ١٠مل من عينة اللبن مباشرة وتسد الأنبوبة بغطاءها المعقم.

٣- تحضن على درجة ٣٥°م فى حمام مائى ثم تترك خمس دقائق وترج جيدا ثم تترك لمدة ساعة أخرى وتفحص الأنابيب - ثم يكرر الفحص

والتقليب كل ساعة - ويحسب الوقت الذى تتخذه الأنبوبة لتتخذ لون مونسل القياسى Munsel colour standard.

تقدير محتويات القشدة فى الخمائر والفطريات :

تعتبر الخمائر من أهم عوامل تلف القشدة أو الزبد وخاصة فى أشهر الصيف أو عند حفظ القشدة فى الجو العادى لمدة طويلة . وهذه الكائنات تكون كحول وثانى أكسيد الكربون بكميات كبيرة مما يسبب حدوث رغوة بالقشدة .

أما الفطريات فهى أهم ملوثات الذبد ويعتبر وجود الفطر *Geotricum candidum* دلالة على الأهمال المتناهى فى تصنيع الذبد .

التمرين السابع والسبعون

١- تعمل تخفيفات $١٠^{-١}$ ، $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ من عينة القشدة.

٢- تفرد ١, مل من كل تخفيف على سطح بيئة آجار البطاطس والجلوكوز مع أضافة ١-٢ مل من محلول معقم ١٠٪ من حمض الترتاريك لكل ١٠٠مل من البيئة حتى تميل الـ pH إلى الحموضة قليلاً .

٣- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة خمس أيام وتعد مستعمرات الخمائر والفطريات التى تظهر .

٤- ينتخب بعض المستعمرات وتحضر منها شرائح وتفحص بعد صبغها بأزرق المثيلين لمدة ١ دقيقه .

٥- ينقل لقاح من المستعمرة إلى أنبوبة لبن عباد الشمس وتحضن على درجة ٢١°م لمدة يومين .

الفحص الميكروبى للزبد

التمرين الثامن والسبعون

١- ضع قطعة صغيرة من عينة الزبد على شريحة نظيفة وتصهر بالتدفئة بأحتراس شديد فوق اللهب .

٢- يوضع نقطة من الأسيتون على الشريحة وتمزج بالزبد المنصهر باستعمال أبرة معقمة ثم يتخلص مما على الشريحة .

٣- كرر ما تم عمله فى رقم ٢ ثم تترك الشريحة لتجف بالهواء .

٤- تصبغ الشريحة ثم يجرى العد الميكروبى كما تم بأستعمال عينات اللبن .

تقدير تعداد الخمائر والفطريات

التمرين التاسع والسبعون (أ)

١- توضع جزء من عينة الزبد فى دورق معقم ثم تصهر فى حمام مائى على درجة ٥٠°م لمدة ١٥ دقيقة .

٢- يعمل تخفيفات ١٠^-١^، ١٠^-٢^ وينقل ١مل من كل تخفيف إلى طبق بترى ثم يصب عليها بيئة آجار البطاطس والجلوكوز .

عد البكتيرات فى الزبد :

التمرين التاسع والسبعون (ب)

١- توضع قطعة من الزبد ١, جم على شريحة نظيفة وتصهر بالتدفئة بأحتراس فوق لهب بنزن .

٢- توضع عدة نقط من الأسيتون وتمزج مع الزبد المنصهر جيداً ثم يتخلص مما على الشريحة بصبه فى كأس .

٣- تكرر هذه العملية ثم تترك الشريحة لتجف فى الهواء .

٤- تصبغ الشريحة بالفوكسين ويقدر تعداد الخلايا فى ١سم^{2} من الشريحة.

البادئات Starters

البادئات عبارة عن مزارع نقية من ميكروبات معينة تضاف أثناء تصنيع بعض منتجات الألبان بقصد أنضاجها وأكسابها صفات مميزة فى الطعم واللون ودرجة الحموضة -وتباع هذه البادئات مجهزة فى الأسواق فى صورة مجففة تحت ضغط وتجميد lyophilized – كما يمكن الأحتفاظ بها فى صورة حية بالمعامل . وللكشف عن مدى كفاءة ودرجة تلوث هذه البادئات يجرى عليها بأستمرار أختبارات للتأكد من صحتها .

التمرين الثمانون

١-جهز ٥٠٠ مل من لبن فرز مبستر فى دورق مخروطى سعة لتر ذو سداده قطنية .

٢- يبرد اللبن إلى درجة ١٠٠ فهرنهيت .

٣- يلقح اللبن بواسطة ٥ مل من مزرعة *Lactobacillus acidophilus* أو *Lactobacillus bulgoricus* ويحضن على درجة٣٧°م لمدة ١٦ساعة – مثل هذه المزرعة تستعمل لتلقيح مزارع أخرى .

٤- يضاف ١مل من المزرعة إلى ٩مل لبن فرز ثم يضاف ١مل من محلول الرسازورين وتوضع الانبوبة فى حمام مائى ٣٧°م .

٥- يقيم البادئ بأنه ممتاز إذا أختزل لونه ، ١مل فى ٣٥ دقيقة .

جيد إذا أختزل لونه ، ١مل فى ٣٥-٥٠ دقيقة .

متوسط إذا أختزل لونه ، ١مل فى ٥٠-٦٠ دقيقة .

ردئ إذا أختزل لونه ، ١مل فى أكثر من ساعة .

دراسة بكتيرات حمض اللاكتيك :

التمرين الحادى والثمانون

١- حضر غشاء من عينة لبن الزبادى قديم بأخذ جزء بالأبرة وخلطه جيداً بماء معقم على سطح شريحة وأفرده جيداً .

٢- أترك الغشاء ليجف فى الهواء ثم ثبته حرارياً .

٣- أغسل الغشاء بعد تبريده فى الزيلول للتخلص من الدهن .

٤- أغسل الشريحة بالكحول للتخلص من ما يعلق عليها من الزيلول .

٥- أغسل بالماء الجارى .

٦- أصبغ الشريحة بصبغة جرام ثم أفحصه بالعدسة الزيتية .

لاحظ وجود نوعين من البكتيرات *Lactobacillus Lactis* ذات خلايا عصوية فى سلاسل ، *Streptococcus Lactis* ذات خلايا كروية فى سلاسل أيضاً .

ثانياً : بكتيريولوجيا الأغذية

البيض ومنتجاته

فحص محتويات البيض الكامل

التمرين الثانى والثمانون

١- يغسل البيض من الخارج بالماء والصابون ثم يغمر فى محلول كحولى ٧٠٪ لمدة ١٠ دقائق ثم يحرق بقايا الكحول من على البيضة باللهب .

٢- يعمل فتحة قطرها ١/٢ بوصة فى الطرف الضيق للبيضة بواسطة مشرط . ثم تقلب محتويات البيضة وهى داخل قشرتها وتفرغ محتوياتها فى وعاء معقم وذلك بتعريض الطرف العريض من البيضة إلى لهب حقيقى .

٣- يمزج محتويات العينة جيداً للتجانس .

٤- يؤخذ ١جرام من العينة ويخلط بـ ٩٩مل من محلول ملحى معقم ويخلط جيداً ثم يجرى التخفيفات ١ : ٢ ، ١ : ٤ بأستعمال محلول ملح فسيولوجى .

٥- نتبع طريقة الصب فى الأطباق وتقدير عدد المستعمرات وتحسب النتيجة على أساس عدد الخلايا فى ١مل من العينة الأصلية .

اللحوم ومنتجاتها

أخذ العينات

التمرين الثالث والثمانون

١- تؤخذ العينات السطحية بواسطة سكين عريض معقم يكشط به السطح فى مواقع متعددة وتجمع ليصير وزنها ١١جم يلاحظ أن لا يزيد سمك الكشط عن ٢سم .

٢- تؤخذ العينات الداخلية من كتل اللحم وذلك بفتح القطعة من أى مكان مناسب لذلك- يراعى تعقيم سطح قطعة اللحم قبل قطعها لأخذ العينة بحرق السطح أو معاملته بالمطهرات الكيماوية . ثم تؤخذ العينة ١١جم من الأنسجة الداخلية .

٣- يضاف إلى العينة (١اجم) ٩٩مل من الماء المعقم ويجرى مزجها فى خلاط كهربائى لمدة ٣دقائق ثم تجرى التخفيفات اللازمة .

٤- يمكن أتباع نفس الطرق فى أخذ عينات من الأسماك واللحوم المحفوظة مثل السجق والسلامون والباسطرمة وما يشابهها .

العد الكلى للبكتيرات

التمرين الرابع والثمانون

١- تستخدم طريقة الأطباق المصبوبة مع أستعمال بيئة آجار العد الكلى

٢- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة ٣ أيام .

عد الخميرة والفطر

التمرين الخامس والثمانون

١-يجرى هذا الأختبار على العينات السطحية فقط باستخدام طريقة الأطباق المصبوبة وباستعمال بيئة آجار البطاطس والدكستروز .

٢- تحضن الأطباق على درجة ٢١°م لمدة ٣-٥ أيام .

الدواجن

التلوث البكتيرى للدواجن يمكن أعتباره بصفة عامة تلوث سطحى لذلك يجرى تقدير التلوث لأسطح الأجزاء المختلفة .

التمرين السادس والثمانون

١- تعقم أسطوانات قصيرة مصنوعة من ورق الكرتون أو أسطوانات معدنية ذات فتحات معلومة المساحة (يفضل مساحة حوالى ١٢سم^{٢}) وذلك بوضعها فى أطباق بترى ومعقم بالأوتوكلاف .

٢- تعقم مراود خشبية مغطى طرفها بالقطن موضوعة فى أنابيب أختبار بالأوتوكلاف أيضاً .

٣- تستعمل أحد الأسطوانات المعقمة وتضغط بشدة على سطح جلد صدر الدجاجة أو أى مكان آخر يراد أختباره .

٤- يجرى مسح المساحة المحصورة فى الأسطوانة بمرود معقم .

٥- تكسر قمة المرود المغطاة بالقطن الممسوح به سطح الدجاجة ويوضع فى كمية معلومة الحجم من الماء المعقم ويرج بها جيداً لضمان توزيع البكتيرات فى الماء .

٦- تجرى التخفيفات اللازمة وتتبع طريقة الصب بالأطباق لأجراء العد الكلى مع أستعمال بيئة الآجار المغذى .

٧- تحضن الأطباق لمدة ٣أيام على درجة ٣٢°م ويجرى تقدير تعداد البكتيرات لكل ١سم^{٢} من سطح الجلد .

الأغذية المعلبة

تقسم الأغذية المعلبة إلى ثلاثة أقسام :

١- أغذية ضعيفة الحموضة ذات pH ٥,٣ أو أكثر - مثال البسلة .

٢- أغذية متوسطة الحموضة ذات pH ٥,٣ - ٤,٥ مثال السبانخ والفاصوليا .

٣- أغذية حمضية ذات pH ٤,٥ أو أقل مثال الطماطم والفواكه .

أختبارات التحضين :

تجرى على العلب السليمة التى لا يظهر عليها أى علامة من علامات الفساد وذلك لغرض التعرف على قابليتها للحفظ دون تلف أو مدى درجة تعقيمها .

تحضن علب الأغذية متوسطة وضعيفة الحموضة لمدة ٤-٣٠ يوم على درجة ٣٧°م ولمدة ٧-١٠ أيام على درجة ٥٥°م ولاداعى لتحضين علب الأسماك على الدرجة الأخيرة - أما الأغذية الحمضية فتحضن لمدة ١٤ يوم على درجة ٣٧°م ولا داعى لتحضينها على درجة ٥٥°م .

يجرى فحص العلب المحضنة على فترات منتظمة للكشف عن حدوث أنتفاخ وتزال العلب المنتفخة وتحلل ميكروبيولوجياً كما يلى .

فتح العلب :

التمرين السابع والثمانون

١- تنظف العلب بالماء والصابون .

٢- تعقم أماكن فتح العلبة ويجرى هذا عادة من قاع العلبة وذلك بتعريضه إلى لهب خفيف - وفى حالة العلب المنتفخة تعقم بالكيماويات بدلاً من اللهب - فى حالة الأغذية السائلة نعمل ثقب قطره حوالى ٢/١ بوصة بواسطة ثاقب -أماالأغذية الصلبة فيعمل فتحة بشكل قرص دائرى بواسطة فتاحة خاصة بذلك .

٤- يلقح أربعة أنابيب من بيئة مرق الجلوكوز والتربتون المضاف إليها دليل البروموكريزول بحوالى ٢ جم أو ١مل من الغذاء المحفوظ بكل أنبوبة للكشف عن البكتيرات الهوائية .

٥- فى حالة الكشف عن البكتيرات غير الهوائية - يضاف إلى البيئة السابقة بعد تسخينها وتبريدها لأخراج الهواء الذائب منها - كمية من آجار التربتون ويترك ليتصلب على سطحها ثم تلقح بنفس الكميات ،

٦- تحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م لمدة ٢ - ٣ أيام .

التسمم الغذائى :

عند الأشتباه فى حدوث تسمم فى غذاء ما يجرى تحضير غشاء مثبت من نقطة ممثلة لهذا الغذاء على شريحة زجاجية ويصبغ بطريقة جرام ويفحص مجهرياً للتعرف على البكتيرة السائدة فى الغذاء وعلى الأخص التابعة لجنس *Clostridum* -وكذلك البكتيرات الكروية الموجبة لهذه الصبغة والعصوية السالبة لها .

١ـ فى حالة التسمم الناتج عن الـ *Clostridia*

التمرين الثامن والثمانون

١- ولأثبات وجود السم بالغذاء وخاصة الناتج من Clostridia تغذى مجموعة من الفئران (أرانب التجارب) على ٢-٥ مل لكل حيوان من الغذاء البارد وأخرى من الغذاء المسخن للغليان وتلاحظ الحيوانات لمدة تتراوح بين عدة ساعات إلى ٣-٤ أيام .

٢- فى حالـة وجـود السـم تمـوت الحيوانـات المغـذاه علـى الغـذاء غـير المسخن خلال ساعات من تناولها للغذاء والتى تتغذى على الغـذاء المسـخن فـأن الحيوانات قد تعيش لمدد طويلة - وموتها بعد ذلك يؤكد وجـود سـم مقـاوم لفعـل الحرارة .

٢- فى حالة التسمم الناتج عن *Staphylococci*

التمرين التاسع والثمانون

١- تلقح أطباق محتوية على آجار الدم بواسطة التخطيط بتخفيف 10^{-1} من مزيج من الغذاء والماء وخلطه جيداً بخلاط كهربائى .

٢- تحضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ساعة .

٣- وجـود مسـتعمرات محللـة للـدم يثبـت وجـود سـلالات مـن *Staphylococci* محدثة للتسمم الغذائى .

٣- فى حالة التسمم الناتج عن *Salmonalla*

التمرين التسعون

١- عنـد الأشتباه بتلـوث الغـذاء بكميـات كبـيرة مـن البكتـيره العصويـة القصيرة السالبة لجرام وغير المتجرثمـة، تلقـح الاطبـاق بطريقـة التخطيـط علـى بيئة أجار كبريتيت البزموت بعينة من الغذاء مباشـرة أو مـن التخفيـف المناسـب منه حتى يمكن الحصول على مستعمرات مفردة .

٢- تحضن الأطباق على درجة ٣٧° م لمدة يوميـن ثـم يفحـص لوجـود مستعمرات مثالية من البكتيره أو البكتيرات التابعة لجنس *Salmonella* .

ثالثاً: بكتيريولوجيا الأراضى

أخذ العينات للتحليل البكتيريولوجى :

التمرين الحادى والتسعون

١- نستعمل أنبوبة معدنية بطول ٣٠سم ويراعى تعقيم الأنبوبة قبل أخذ العينة.

٢- وغالباً ما تكون العينات سطحية على بعد ١٠-١٥ سم من سطح التربة.

٣- توضع العينات مباشرة فى أكياس بلاستيك أو أوانى خاصة نظيفة.

٤- يؤخذ ٥ عينات بطريقة عشوائية لنوع واحد من الأراضى.

٥- تجفف العينات فى الهواء .

٦- تمرر خلال منخل سعة ثقوبه ٥ مم لأزالة الحصى والأحجار وجذور النباتات ثم تمرر خلال منخل سعة ثقوبه ١ مم ثم توضع فى أوعية محكمة القفل .

٧- تحفظ العينات على درجة حرارة منخفضة أثناء التخزين وتحلل فى أقرب وقت ممكن أقل من أسبوعين .

٨- تخلط العينات الخمس للأرض الواحدة جيداً ثم تقسم إلى قسمين أو ثلاث ويؤخذ منها ١٠ مم لتحضير معلق الأرض .

٩- يرج المعلق لمدة ١٥ دقيقة بواسطة جهاز رج لضمان تفريق الأحياء الدقيقة عن حبيبات التربة .

١٠- يلزم قبل إجراء معلق الأرض أن تقدر فى البيئة نسبة الرطوبة حتى يمكن حساب النتائج على أساس الوزن الجاف للبيئة .

تقدير تعداد البكتيرات فى التربة :

أ- العد المباشر

التمرين الثانى والتسعون

١- توضع ١جم من عينة الأرض فى أنبوبة أختبار محتوية على ٩مم من محلول آجار مائى ١,٪ أو محلول جيلاتين ٠١٥,٠ ٪ وترج جيداً وتترك لتترسب حبيبات الأرض الكبيرة ٠

٢- ينقل ٠١,٠ مل من المعلق إلى شريحة زجاجية ويفرد بانتظام فى مساحة ١سم٢ وتترك الشريحة لتجف بالهواء .

٣- تغمر الشريحة فى محلول حمض الخليك ٤٠٪ لمدة ١-٣ دقائق ثم تغسل بالماء٠

٤- توضع الشريحة على حمام مائى (كأس به ماء يغلى) ثم تصبغ بصبغة الاريثروسين لمدة ٥-٦ دقائق - مع تجنب جفاف الصبغة(يضاف المزيد منها كلما قلت كميتها على الشريحة) - تظهر الخلايا البكتيرية بلون أحمر قاتم تحت المجهر.

٥- يقدرعدد الخلايا فى كل من ٢٥ حقل ميكروسكوبى والمتعرف على مساحته من قبل ويأخذ المتوسط .

ب ـ العد بطريقة الأطباق

أولاً : البكتيرات الهوائية

التمرين الثالث والتسعون

١ـ يجرى عمل تخفيفات من معلق التربة ١٠$^{-٣}$ إلى ١٠$^{-٧}$

٢- يستعمل٣أطباق من بيئة مستخلص الأرض وخلاصة الخميرة لكل تخفيف ،

٣- تحفظ الأطباق على درجة ٢٥°م لمدة ٥-٧ أيام ثم تعد المستعمرات.

٤- يستبعد الأطباق المحتوية على أقل من ٣٠ مستعمرة والتى تزيد عن ٣٠٠ مستعمرة وكذلك الأطباق التى تظهر تضاد بين نمواتها أو المحتوية على فطريات أو المحتوية على مستعمرات غير موزعة بأنتظام .

٥- توصف المستعمرات ويحضرغشاء من كل نوع منها ويصبغ بطريقة جرام .

ثانياً : البكتيرات الهوائية المتجرثمة

التمرين الرابع والتسعون

١- تجرى الخطوات السابقة ولكن بعد بسترة التخفيفات المستعملة وذلك بوضع ١٠مل من كل تخفيف فى أنبوبة معقمة ثم تسخن فى حمام مائى درجته ٨٠°م لمدة ١٠ دقائق - ثم يؤخذ منها الكمية اللازمة ليلقح الطبق .

٢- المستعمرات الناتجة تكون للبكتيرات الهوائية المتجرثمة حيث تعمل البسترة على قتل الخلايا الخضرية والبكتيرات غير المتجرثمة .

ثالثاً : البكتيرات اللاهوائية

التمرين الخامس والتسعون

١- تتبع كل خطوات عد مستعمرات البكتيرات الهوائية ،

٢- تحفظ الأطباق تحت ظروف غير هوائية (خالية من الأكسجين) راجع طرق تنمية البكتيرات غير الهوائية .

عزل البكتيرات من العقد الجذرية :

التمرين السادس والتسعون

١- تغسل جذور النبات البقولى، ويراعى أن يكون صغير العمر، بالماء وتنزع منه العقد الجذرية كبيرة الحجم مع أجزاء من الشعيرات الجذرية .

٢- توضع العقد فى أنبوبة محتوية على هيبوكلوريت الصوديوم٥ ٪ لمدة ٥ دقائق.

٣- تنقل العقد الجذرية بواسطة ملقط معقم إلى أنبوبة بها كحول ٧٥٪ وتترك لمدة خمس دقائق .

٤- تغسل العقد بالماء المعقم عدة مرات .

٥- تنقل العقدإلىطبق بترى معقم به٣مل ماء معقم وتهرس بمشرط معقم.

٦- تنقل نقطة من المعلق بواسطة أبرة ذات العقدة معقمة إلى طبق بترى معقم يحتوى ١مل ماء معقم ويخلط بها .

٧- ينقل نقطة بواسطة أبرة معقمة إلى طبق بترى آخر يحتوى على١مل ماء معقم ويخلط بها وتكرر العملية فى طبق ثالث - يمكن عمل غشاء للفحص المجهرى من هذا التخفيف .

٨- يصب ١٠ مل من بيئة آجار المانيتول وخلاصة الخميرة فى كل من الأطباق الثلاث الأخيرة وترج جيداً لتوزيع اللقاح .

٩- تحضن الأطباق مقلوبة على درجة ٢٨°م حتى تظهر نموات مستعمرات بكتيرية .

١٠- تحضر أغشية من المستعمرات الناتجة وتجرى تحضير مزارع فى أنابيب آجار المانيتول والخميرة .

أختزال النترات

قد تختزل الأزوتات الموجودة بالأرض تحت ظروف غير هوائية بواسطة أنواع كثيرة من البكتيرات - بعضها يختزل الآزوتات إلى أزوتيت والبعض الآخر يختزل الآزوتيت إلى نشادر ولأختبار أختزال الآزوتات يتبع مايلى :

التمرين السابع والتسعون

١- تلقح أنابيب درهام محتوية على بيئة آزوتات الجلوكوز بمقدار ١مل من معلق الأرض أو معلق سماد عضوى أو ماء الترعة أو البحيرة - مع ترك أنبوبة بدون تلقيح .

٢- تحفظ الأنابيب على درجة حرارة ٣٠°م لمدة أسبوع .

٣- تختبر محتويات كل أنبوبة لوجود الآزوتات والآزوتيت والنشادر وغاز الآزوت.

٤- يحضر غشاء من كل أنبوبة ويصبغ بطريقة جرام .

ولأختبار المواد السابق الأشارة إليها :

أولاً : أختبار النشادر

التمرين الثامن والتسعون

يوضع نقطتان من المزرعة فى تجويف طبق خزفى أبيض يضاف إلى كل منهما نقطة من كاشف نسلر. يتكون راسب أصفر يدل على وجود النشادر.

ثانياً : أختبار وجود الآزوتيت

التمرين التاسع والتسعون

١- يوضع ثلاث نقط من كاشف ترومسدورف فى تجويف طبق خزفى أبيض.

٢- يضاف إلى التجويف نقطة من حامض كبريتيك مخفف ١:٣ .

٣- يضاف نقطة من المزرعة .

٤- تكون لون أزرق يدل على وجود الآزوتيت .

ثالثاً : أختبار وجود النترات

التمرين المائه

١- تغلى كمية من المزرعة مع كمية مماثلة من الكحول وكبريتات النشادر بتركيز ٢٥٪ مع أضافة ١٠ نقط من حمض الخليك وذلك للتخلص من الآزوتيت .

٢- توضع نقطة من المخلوط السابق فى تجويف طبق خزفى أبيض .

٣- يضاف للتجويف نقطة من كاشف داى أمين ثم نقطة من حمض كبريتيك مركز٠

٤- تكون لون أزرق يدل على وجود النترات .

التقدير الحيوى لمحتويات الأرض من البوتاسيوم :

التمرين الحادى بعد المائه

١ـ جهز أربعة دوارق مخروطيـة سـعة ١٢٥مـل ومحتويـة علـى ٣٠مـل بيئة مهلش معقمة.

٢ـ أضف لكل دورق ٥ ,٢ جم من عينة التربة .

٣ـ أضف لكل دورق ٥, مل من معلق جراثيم *Aspergillus niger* .

٤ـ تحضن الدوارق على درجة ٣٥°م لمدة ٤–٥ أيام .

٥ـ ينقل النمو الفطرى المتكون بشكل طبقــة فـوق البيئـة مـن كـل دورق إلى كأس زجاجى ويغسل جيداً بالماء لأزالة حبيبات التربة العالقة به .

٦ـ تجمع نموات الأربعة دوارق وتجفف على أوراق ترشيح ثم توضـع فىعلبه من الألمنيوم معروفة الوزن وتجفف ٤ ساعات فى فرن الهواء السـاخن على درجة٧٠–٩٠°م لمدة ٤ساعات ثم على درجة ١٠٥°م لمدة ساعتين .

٧– يقدر الوزن الجاف للمجموع الميسليومى فى الاربع علـب ويخصـم وزن العلب فإذا كان الوزن أقل من ٤ ,١ جم تحتاج الأرض إلى بوتاسيوم وإذا كان الوزن من ٤ ,١ إلى ٢ جم تحتاج الأرض إلى البوتاسيوم بقلة .أما إذا كان الوزن أكثر من ٢ جم فلا تحتاج الأرض لبوتاسيوم .

رابعاً: بكتريولوجيا المياه

عادة يختبر المياه للتعرف على مدى صلاحيتها للاستعمال الأدمى وخاصة للتأكد من عدم وجود بكتيرات ممرضة وضارة بالصحة مثل بكتيرات القولون التى يدل وجودها على تلوث المياه بمياه الصرف الصحى . ولإجراء ذلك يراعى ما يلى :

تؤخذ عينات من المياه فى زجاجات نظيفة ومغسولة جيداً ومعقمة فى فرن الهواء الساخن – يراعى فى أخذ العينة الشروط البكتيرولوجية للتعامل مع العينات مع عدم ملئ الزجاجة إلى آخرها ليسهل الرج قبل الفحص .

إذا أريد أختبار مياه الصنبور يشترط فتحه لمدة ٥دقائق قبل أخذ العينة – وعند أخذ عينة من مياه حمامات السباحة أومياه الشرب المعاملة بالكلور يجب معاملتها بأحدى المواد المضادة للكلور مثل الثيوكبريتات حتى يصبح تركيزها فى الماء ١٠٠ ملليجرام/لتر ماء .

العد الكلى :

التمرين الثانى بعد المائه

١- تحضر التخفيفات الآتية من العينة ١٠$^{-١}$ ، ١٠$^{-٢}$.

٢- يوضع ١مل من كل تخفيف فى طبق بترى معقم .

٣- يصب على كل طبق بيئة آجار مغذى ويخلط جيداً بالعينة المخففة وتترك لتتصلب .

٤- تحضن على درجة ٢٧°م لمدة ٤٨ ساعة ثم تعد المستعمرات الناتجة .

الأختبار التخمينى لبكتيرة القولون Presumptive test

التمرين الثالث بعد المائه

١- يضاف ١مل من العينة بدون تخفيف وكذلك ١مل من تخفيف 10^{-1} إلى كل من أنابيب دورهام المحتوية على ٥مل من مرق تخمر اللاكتوز .

٢- تحضن الأنابيب على درجة ٣٧°م وتفحص بعد ٢٤-٤٨ ساعة للتعرف على تكوين حامض وغاز .

٣- تكون حامض وغاز يشغل ١٠٪ من الأنبوبة الصغيرة الداخلية خلال ٢٤ساعة يدل على أن الأختبار موجب .

عدم تكون غاز خلال ٤٨ ساعة يدل على أن الأختبار سالب وغياب بكتيرة القولون.

الأختبار التأكيدى Comfermative test

التمرين الرابع بعد المائه

١- تؤخذ أحد الأنابيب التى ظهر بها غاز فى الأختبار السابق .

٢- يلقح بها طبق بترى محتوى على بيئة أندروآجار وطبق آخر به آجار أيوسين أزرق الميثيلين على أن يكون التلقيح بالتخطيط .

٣- تحفظ الأطباق على درجة ٣٧°م ثم تفحص بعد ٢٤-٤٨ ساعة للتعرف على مستعمرات ذات بريق معدنى على بيئة الأيوسين أزرق المثيلين وذات لون أحمر ذو لمسه خضراء على بيئة أندروآجار وهى مستعمرات *E. coli* .

الأختبار التكميلى Complementry test

التمرين الخامس بعد المائه

١- ينقل جزء من المستعمرة التى لها صفات *E. coli* إلى أنبوبة دورهام المحتوية على مرق تخمر اللاكتوز .

٢- تكون غاز وحمض بعد ٤٨ساعة على ٣٧°م يؤكد وجود بكتيرة القولون .

٣- تعزل البكتيرة فى صورة نقية ويجرى عليها الأختبارات الأخرى .

خامساً : البكتيرولوجيا النباتية
Phytobacterology
(البكتيرات الممرضة للنبات)

تصاب النباتات بالعديد من البكتيرات التى تسبب لها أعراضاً خطيرة تؤدى إلى موت النبات أو الأقلال من إنتاجه بدرجة ملحوظة وعادة ما تتخذ الأصابات البكتيرية للمحاصيل النباتية المظهر الوبائى وذلك لسرعة أنتشارها بالعوامل الجوية كالأمطار المصحوبة بالرياح والحشرات وغيرها من وسائل نقل الأمراض.

وفيما يلى بعض التمارين لدراسة بعض هذه الأمراض .

التمرين السادس بعد المائة

١- حضر مزارع حديثة من البكتيرات الآتية :

Erwinia carotovora , *Agrobacterium tumefaciens* , *Escherichia coli*

٢- أغسل أحد جذور الجزر جيداً ثم عقمه سطحياً وذلك بغمره فى محلول هيبوكلوريت الصوديوم٥ ٪ لمدة ٥دقائق ثم أغسله بالماء المعقم عدة مرات، يفضل أعادة التعقيم بالتلهيب بغمره فى كحول وتعريضه للهب حتى ينطفئ ما يشب به من لهب .

٣- قطع الجزر بشكل شرائح ذات سمك لايقل عن ١سم بواسطة سكين معقم . وضع الشرائح بملقاط معقم فى أربعة أطباق بترى معقمة يحتوى كل منهاعلى٣-٥ مل ماء معقم .

٤- لقح سطح شريحة الجزر بكل من *E. carotovora* وفى الثانى بواسطة *Agrobacterium tumefaciens* وفى الثالث بواسطة *E. coli* والرابع يترك بدون تلقيح للمقارنة .

٥- تحضن في حضان على درجة ٢٥°م لمدة أسبوعين .

٦- أفحص الأطباق دورياً كل ٤٨ساعة فى حالة الطبق الأول يتكون عفن جزئى لشريحة الجزر خلال ٤٨ساعة وفى الثانية تتكون أنسجة تورمية على سطح الشريحة بعد فترة تتراوح بين ١٠-١٤ يوم وفى الثالث والرابع لايحدث للشرائح أى شئ .

عزل بكتيرة العفن الطرى *Erwinia carotovora var carotovora*

التمرين السابع بعد المائه

١- حضر درنة بطاطس مصابة بالعفن الطرى فى مراحله الأولى - ثم عقمها من الخارج بمحلول من هيبوكلوريت الصوديوم ٥٪ لمدة ٥دقائق ثم أغسلها بالماء المعقم لأزالة بقايا المطهر واتركها لتجف .

٢- أقطع الدرنة إلى نصفين بواسطة مشرط أو سكين معقم بالتلهيب .

٣- بواسطة أبرة تلقيح معقمة خذ جزء من أنسجة الدرنة فى حدود الأنسجة المتهتكة وليس منها - وتنقل إلى طبق بترى معقم يحتوى على ١مل ماء معقم وتهرس جيداً .

٤- تؤخذ نقطة من المعلق إلى طبق بترى آخر محتوى على ١مل ماء معقم وتخلط به جيداً .

٥- تكرر العملية فى طبق ثالث بنفس الشروط .

٦- تجهز بيئة آجار مغذى سائلة على درجة ٤٠°م ويصب منها ١٠مل تقريباً بكل طبق من الأطباق الثلاث - تحرك الأطباق حركة رحويه لتوزيع اللقاح فى البيئة .

٧- توضع الأطباق بالحضان على درجة ٢٥°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم تفحص وتعزل البكتيرات من المستعمرات المفردة والمميزة .

٨- لاختبار كفاءة العزل يعدى شرائح جزر فى أطباق بترى معقمة ومحتوية على قليل من الماء وتترك ٤٨ ساعة كما فى التمرين السابق - حدوث عفن طرى بالشرائح يؤكد كفاءة العزل .

عزل بكتيرة اللفحة النارية للكمثرى *Erwinia amylovora var amylovora*

التمرين الثامن بعد المائه

١- يجهز مجموعة من الأزهار المصابة بلفحة الأزهار وتغسل واحدة جيداً عدة مرات بتمريرها فى سلسلة من الماء المعقم (٥-٦ مرات) ثم توضع الزهرة فى طبق بترى معقم ومحتوى على ٢مل ماء معقم .

٢- تسحق الزهرة فى الماء بواسطة مشرط معقم .

٣- ينقل نقطة بواسطة أبرة تلقيح معقمة إلى طبق بترى آخر محتوى على ١مل ماء معقم .

٤- تكرر العملية ٣ مرات وذلك بنقل نقطة من كل طبق إلى الآخر .

٥- تصب كمية مناسبة من الآجار المغذى + ٥٪ سكروز فى الأطباق الثلاث الأخيرة وتحرك الأطباق رحوياً لتوزيع اللقاح .

٦- تحضن الأطباق على درجة ٢٥°م لمدة ٢-٤ يوم يفحص خلاله يومياً .

٧- يعزل البكتيرة فى المستعمرات المميزة لها .

٨- لإختبار كفائة العزل - تعدى ثمار كمثرى خضراء صغيرة غير تامة النضج عن طريق الوخز بأبره تحمل لقاح من المستعمرات المميزة -

تحضن الثمار المعداه وهى فى جو رطب على درجة حرارة المعمل لمدة ٧-١٠ أيام، ظهور نموات بكتيرية (ooze) غزيرة علاوة على اسوداد أماكن الوخز يدل على كفاءة العزل .

عزل بكتيرة التدرن التاجى *Agrobacterium tumefaciens*

التمرين التاسع بعد المائه

١- يغسل الجزء المتدرن من العينة جيداً بالماء ثم يعقم سطحياً بمسحه عدة مرات بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم ٥٪ ثم يغسل عدة مرات بالماء المعقم .

٢- يقطع الجزء المتدرن إلى نصفين بواسطة مشرط معقم .

٣- يعقم المشرط ثم يؤخذ به قطعة صغيرة من الطبقة الخارجية من النسيج أسفل القشرة مباشرة .

٤- توضع هذه القطعة فى طبق بترى محتوى على ١مل ماء معقم ثم تهرس القطعة فى الماء ليتكون معلق .

٥- يؤخذ نقطة من المعلق الناتج وتخلط بكمية ١مل ماء معقم فى طبق بترى آخر معقم .

٦- يؤخذ نقطة من الطبق الثانى ويخلط بكمية ١مل ماء معقم فى طبق ثالث وتكرر العملية فى طبق رابع .

٧- يصب كمية من الآجار المغذى بكل طبق من الأطباق الثلاث الأخيرة.

٨- تحضن الأطباق على درجة٢٥°م لمدة أسبوع يفحص خلالها يوميا.

٩- تعزل البكتيرة فى مزرعة نقية من مستعمرات مفردة مميزة للبكتيرة .

١٠- لاختبار كفاءة العزل يلقح عدة شرائح جزر موضوعة فى أطباق بترى معقمة محتوية على قليل من الماء . وتترك بالحضان ٢٥°م لمدة أسبوعين يفحص خلالها لتكون نموات تكلسية غير منتظمة على سطح الشرائح وهذا يؤكد كفاءة العزل .

عزل بكتيرة العفن البنى فى البطاطس *Pseudomonas solanacearum*

التمرين العاشر بعد المائه

١- تجهز درنة مصابة بالعفن البنى وتغسل جيداً بالماء ثم يعقم سطحها بمسحه بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم ٥٪ عدة مرات ثم غسلها بالماء المعقم عدة مرات أيضاً.

٢- تشق الدرنة إلى نصفين وتترك الشقين تحت ناقوس زجاجى نظيف لمدة ٢٤-٤٨ ساعة مع توفير الرطوبة .

٣- يضغط على أحد نصفى الدرنة فتظهر نموات بكتيرية(ooze) غزيرة من النسيج الوعائى .

٤- بواسطة أبرة معقمة يؤخذ جزء من هذه النموات البكتيرية وتخفف فى ١مل معقم بطبق بترى .

٥- يستعمل المخلوط الناتج فى تخطيط بيئة آجار جلسرول + ٠,٠٠٢٪ تراى فينايل تترازوليم كلوريد بأطباق بترى .

٦- تعزل البكتيرة فى مزرعة نقية من أحد المستعمرات المميزة .

راجع التمرين الحادى و السبعون والخاص بعزل طفرات مختلفه فى قدراتها المرضيه .

ملحق ١

البيئات الغذائية

بيئة آجار ايوسين أزرق الميثيلين

ببتون	١٠	جرام
لاكتوز	١٠	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٢	جرام
آجار	٢٠	جرام
أيوسين	,٤	جرام
أزرق الميثيلين	,٠٦٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

الـ pH النهائى ١ ,٧

بيئة آجار تشابك دوكس

تستعمل عادة لزرع الفطريات

سكروز	٣٠	جرام
نترات صوديوم	٣	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٥	جرام
كلوريد بوتاسيوم	,٥	جرام
كبريتات حديدوز	,٠١	جرام
آجار	١٥-٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار جلوكوز

مستخلص لحم	٣	جرام

ببتون	٥	جرام
جلوكوز	١٠	جرام
آجار	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئةآجار دكستروز البطاطس

تستعمل عادة لزرع الفطريات

مستخلص مائى لـ٢٠٠ جرام مز البطاطس بعد غليه

لمدة ١٥ دقيقه وترشيحه	٢٠	جرام
دكستروز	٢٠	جرام
آجار	١	لتر
ماء مقطر		

بيئة آجار مغذى

مستخلص لحم	٣	جرام
ببتون	٥	جرام
آجار	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار اختبار الحركه Motility test agar

تربتوز	١٠	جرام
كلوريد صوديوم	٥	جرام
آجار	٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار الثيوجليكولات

ثيوجليكولات الصوديوم	,٥	جرام

آجار	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار خلاصة الخميره

فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٢	جرام
خلاصة لحم	٣	جرام
خلاصة خميره	٢	جرام
تربتون	٥	جرام
جلوكوز	١٠	جرام
آجار	١٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة آجار الدم

مستخلص لحم	٣	جرام
تربتوز	١٠	جرام
كلوريد صوديوم	٥	جرام
آجار	١٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

قبل صب البيئه فى الاطباق يضاف ٥٪ دم مزال معقم.

بيئة آجار مانيتول خلاصة الخميره

فوسفات ثنائى البوتاسيوم	,٥	جرام
$Mg.SO_4 - 7H_2O$ •	,٢	جرام
Na cl •	,١	جرام
$CaCO_3$ •	٣	جرام
مانيتول	١٠	جرام

خلاصة خميره	١٠	جرام
آجار	١٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

يستغنى عن $CaCO_3$ فى حالة الصب فى الاطباق

جيل البكتات

فوسفات احادى الامونيوم	١	جرام
(Kcl)	,٢	جرام
($Mg\ SO_4$)	,٢	جرام
ماء مقطر	١	لتر

يضاف ٢٠ جرام بكتات الصوديوم ثم يسخن إلى قرب الغليان ويقلب لمدة ٥ دقائق على هذه الدرجه من الحراره ثم يضاف إلى المخلوط ٨مل من محلول $Cacl_2$ وذلك لتكوين بكتات كالسيوم - ثم يعبئ فىالاطباق ويعقم

بيئة أحمر الكنغو

مانيتول	١٠	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	,٥	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٢	جرام
كربونات كالسيوم	٣	جرام
كلوريد صوديوم	,١	جرام
مستخلص خميرة	١	جرام
أحمر كنغو(١ : ٤٠٠ محلول مائى)	١٠	مل
آجار	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة أومليانسكى

كبريتات أمونيوم	١	جرام
فوسفات بوتاسيوم ثنائية	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٥	جرام
كربونات كالسيوم	٢	جرام
كلوريد صوديوم	,١	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة السترات

فوسفات صوديوم وأمونيوم	١،٥	جرام
فوسفات أحادية البوتاسيوم	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٢	جرام
سترات صوديوم	٣	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة جيلاتين مغذى

مستخلص لحم	٣	جرام
ببتون	٥	جرام
جيلاتين	١٥٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

(تعقم البيئة تعقيم متقطع)

بيئة دييوز

نترات صوديوم	٠و ٥	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	٠و ٥	جرام

كلوريد بوتاسيوم	٥ و٠	جرام
كبريتات حديديك	٠٠١ و٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة فوجس بروسكاور - أحمر الميثيل

ببتون	٧	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٥	جرام
جلوكوز	٥	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة كليجلر

مستخلص لحم	٣	جرام
مستخلص خميرة	٣	جرام
ببتون	١٥	جرام
بروتيوزببتون	٥	جرام
لاكتوز	١٠	جرام
جلوكوز	١	جرام
كبريتات حديدوز	٢ و٠	جرام
كلوريد صوديوم	٥	جرام
ثيوكبريتات صوديوم	٣ و٠	جرام
آجار	١٥	جرام
أحمر فينول	٠٢٤ و٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة لبن البروموكريزول الأرجوانى

لبن فرز طازج	١٠٠	مل

بروموكريزول الأرجونى	٠١٦ و٠ جرام

(تعقيم البيئة تعقيم متقطع)

بيئة لبن عباد الشمس

يحضر بأضافة كمية كافية من محلول مائى مشبع من عباد الشمس إلى لبن فرز طازج حتى يصبح اللون أزرق واضح (تعقم البيئة تعقيم متقطع)

بيئة مرق التريبتون

تريبتون	١٠ جرام
مستخلص لحم	٣ جرام
ماء مقطر	١ جرام

بيئة مرق النترات

مستخلص لحم	٣ جرام
ببتون	٥ جرام
نترات بوتاسيوم	١ جرام
ماء مقطر	١ جرام

بيئة مرق أختزال الكبريتات

كبريتات الامونيوم	٢ جرام
كبريتات الحديدوز	,٠١ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	,٥ جرام
لكتات صوديوم	٥ جرام
ماء مقطر	١ لتر

بيئة مرق الازوتات

ببتون خالى من النترات	١ جرام

كلوريد صوديوم	,٥ جرام
نترات بوتاسيوم	,٥ جرام
ماء مقطر	١ لتر

بيئة مرق اللاكتوز

مستخلص لحم	٣ جرام
ببتون	٥ جرام
لاكتوز	٥ جرام
بروموثيمول الأزرق	٠١٦ و٠ جرام
ماء مقطر	١ لتر

(تعقم البيئة تعقيم منتظم)

بيئة مرق اليوريا

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١ جرام
كلوريد كالسيوم	١ و٠ جرام
كبريتات مغنسيوم	٣ و٠ جرام
كلوريد صوديوم	١ و٠ جرام
كلوريد حديديك	٠١ و٠ جرام
مستخلص لحم	٥ جرام
يوريا	٢٠ جرام
ماء مقطر	١ لتر

تذاب اليوريا فى ٥٠ مل ماء وتعقم على حدة بالترشيح ثم تضاف إلى باقى مكونات البيئة بعد تعقيمها .

سليلوز الببتون

فوسفات ثنائى الامونيوم	٢ جرام

فوسفات احادى البوتاسيوم	١	جرام
$(MgSo_4 - 7.H_2O)$	٣,	جرام
$(CaCl_2)$	٤,	جرام
$(FeCl_3 - 6H_2O)$	٠١,	جرام
$(CaCO_3)$	٣	جرام
ببتون	٥	جرام

يضبط pH إلى ٤, ٧

يعبئ فى انابيب كبيره ويضاف لكل انبوبه ٣, جرام قصاصات ورق ترشيح ـ كما يضاف $CaCO_3$ بعد التعقيم

بيئة مرق ببتون أملاح الصفراء واللاكتوز ودليل الاخضر الزاهى

صفراء ثور (Bacto)	٣٠	جرام
لاكتوز	٥	جرام
ببتون	٢٠	جرام
NaCL	٥	جرام
أخضر زاهى ١٪	٢	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة مرق خلاصة المولت

مستخلص المولت	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

بيئة مرق دكستروز تريبتون بروموكريزول الارجوانى

تريبتون	١٠	جرام

دكستروز	٥ جرام
برومو كريزول أرجوانى	٠٤ و٠ جرام
ماء مقطر	١ لتر

بيئة مرق مغذى

ببتون	٥ جرام
مستخلص لحم	٣ جرام
ماء مقطر	١ جرام

بيئة مرق الفاج ذو التركيز عشرة أمثال المرق المغذى العادى

ببتون	١٠٠ جرام
مستخلص خميره	٥٠ جرام
ص كل	٢٥ جرام
فوسفات ثنائى البوتاسيوم	٨٠ جرام
ماء مقطر	١ لتر

يضبط الـpH النهائى ٦, ٧

ملحق ٢

الصبغات والمحاليل التى تستعمل فى طرق الصبغ المختلفة

ارثروسين

أرثروسين	١	جرام
محلول فينول ٥٪	١٠٠	مل
كلوريد كالسيوم	,٠٥	جرام

أزرق الميثيلين

أزرق الميثيلين	,٣	جرام
كحول ٩٥٪	٣٠	مل
ماء مقطر	١٠٠	مل

أذب أزرق المثيلين فى الكحول ثم أضف الماء المقطر ورشح المحلول خلال ورق ترشيح .

صبغة الأسواط

محلول أ

حمض تانيك	٤	جرام
كلوريد حديديك	١,٥	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

إخلط السابق ثم أضف إليه الآتى :

أيدرو أكسيد صوديوم ١٪	١	مل
فورمالين ٤٠٪	٢	مل

يجب أن يكون الـpH النهائى للمحلول السابق ٥, ١-٨, ١

محلول ب

نترات فضه	٢	جرام

ماء مقطر ١٠٠ مل

أذب نترات الفضه ثم احتفظ بـ ١٠ مل . ثم اضف إلى الـ ٩٠ مل الباقيه أيدروأكسيد الأمونيوم نقطه نقطه حتى يتكون راسب .

أستمر فى أضافة أيدروكسيد الأمونيوم نقطه نقطه حتى يزول الراسب ثم توقف عن الأضافه .

ثم أضف محلول نترات الفضه (١٠ مل المحتفظ بها) إلى المحلول الرئيسى نقطه نقطه حتى تتكون عكاره خفيفه . أختبر pH والذى يجب أن يكون من ٨, ٩-١٠ .

يجب أجراء الصبغ فى خلال ٤ ساعات من تحضير الصبغه .

صبغة الجراثيم

طريقة Schaeffer and Fulton المعدلة

محلول أخضر المالاكيت

أخضر المالاكيت	٥ جرام
ماء مقطر	١٠٠ مل

محلول سفرانين

سفرانين	,٥ جرام
ماء مقطر	١٠٠ مل

صبغة المقاومه للاحماض

طريقة Ziehl and Neelsen

كربول الفوكسين

محلول أ

فوكسين قاعدى	,٣	جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	١٠	مل

محلول ب

فينول	٥	جرام
ماء مقطر	٩٥	مل

ثم أخلط محلول أ إلى محلول ب تدريجيا مع التقليب . ثم يرشح المخلوط خلال ورقة ترشيح قبل الاستعمال .

كحول حامضى

كحول ايثايل ٩٥٪	٩٧	مل
حامض يد كل مركز	٣	مل

أزرق ميثيلين

مثل التحضير السابق

صبغة جرام

طريقة Huc ker

صبغة الكريستال البنفسجية

محلول أ

كريستال بنفسجى	٤	جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	٢٠	مل

محلول ب

أكسالات أمونيوم	,٨	جرام
ماء مقطر	٨٠	مل

إخلط محلول أ ، ب بكميات متساويه . ويفضل تخفيف المحلول (أ) عشر مرات على ان يخلط ٢٠ مل من

المحلول بكمية مساوية من المحلول (ب) .

محلول اليود

يود	١	جرام
يوديد بوتاسيوم	٢	جرام
ماء مقطر	٣٠٠	مـل

إصحن اليود ويوديـد البوتاسـيوم فـى هـاون ثـم يذاب فـى الماء . يحفظ المحلول فى زجاجات ملونه .

الصبغة العكسية

سفرانين	,٢٥	جرام
كحول ٩٥٪	١٠	مـل
ماء مقطر	١٠٠	مـل

أذب السفرانين فى الكحول ثم اضف الماء ورشح .

صبغة الغلاف

طريقة Anthony

صبغة الكريستال البنفسجى

كريستال بنفسجى	١	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

محلول كبريتات نحاس

كبريتات نحاس	٢٠	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

صبغة فونتانا

مثبت فونتانا

حمض خليك ثلجى	١	مـل

فورمالين	٢	مـل
ماء مقطر	١٠٠	مـل

معمق فونتانا

حمض تانيك	٥	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

محلول فضة فونتانا

١ـ يذاب ٥ جرام نترات فضة فى ١٠٠مل ماء مقطر.

٢ـ خفف ٥مل من محلول أمونيا مركزة بـ ٤٥ مل ماء مقطر .

٣ـ خذ ٩٠مـل من محلـول نـترات الفضـة وأضـف إليــه ٢٥مل من محلول مخفف من الأمونيا .

٤ـ استمر فـى اضافـة الأمونيـا نقطـة نقطـة حتـى يـذوب الراسب المتكون .

٥ـ أضف محلول نترات الفضة(١٠مل المحتفـظ بهـا) إلـى المحلول الرئيسى نقطة نقطة حتى تتكون عكارة خفيفة .

نجروسين

نجروسين	١	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

ملحق ٣

المحاليل

احمر الميثيل

أحمر ميثيل	,١ جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	٢٥٠ مـل
ماء مقطر	٢٥٠ مـل

أذب أحمر الميثيل فى الكحول ثم أضف الماء المقطر ورشح .

الفانفثايل امين

الفانفثايل امين	٥ جرام
حامض كبريتيك مركز	٨ مـل
ماء مقطر	١ لـتر

أضف حامض الكبريتيك إلى الماء المقطر ثم أضف الالفانفثايل أمين وقلب حتى يتم الذوبان .

باريت أ

الفانفثول	٦ جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	١٠٠ مـل

باريت ب

ايدروأكسيد بوتاسيوم	١٦ جرام
ماء مقطر	١٠٠ مـل

حمض بوريك ٢, جزيئى

بللورات حمض بوريك	١٢,٤ جرام
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠ مـل

حمض ستريك ١, جزيئى

حمض ستريك	٢١ جرام
ماء مقطر حتى يصل إلى	١٠٠٠ مل

حمض سلفانيليك

حمض سلفانيليك	٨ جرام
حمض كبريتيك مركز	٤٨ مل
ماء مقطر حتى يصل إلى	١٠٠٠ مل

أضف حمض الكبريتيك إلى ٥٠٠مل ماء مقطر . ثم
اضف حمض سلفانيليك ثم ماء مقطر ليصل الحجم
إلى١٠٠٠ مل .

فوسفات ثنائية البوتاسيوم ٢, جزيئى

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٣٤,٩ جرام
ماء مقطر حتى يصل إلى	١٠٠٠ مل

كوفاك

بارا ـ داى ميثيل ـ أمينو ـ بنزالدهيد	٥ جرام
كحول ايمايل أو بيوتايل	٧٥ مل
حمض يد كل مركز	٢٥ مل

مزيج فاسبار

فازلين	١ جزء
شمع بارافين	١ جزء

مزيج لهضم البروتينات

حمض كبريتيك مركز	٥٠٠ مل
كبريتات صوديوم	٧٥ جرام

سليناايت النحاس	٢ جرام
ماء مقطر	٥٠٠ مـل

منظم فوسفاتى

محلول أ

فوسفات أحادية البوتاسيوم	,٩٠٧٨ جرام
ماء مقطر	١٠٠ مل

محلول ب

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	,٩٤٦٥ جرام
ماء مقطر	١٠٠ مـل

أخلط ١, ٦١ من المحلول ب مع ٩, ٣٨ مل من المحلول أ (pH = ٧) .

نسلر

أذب ٥, ٦٢ جرام من يوديد البوتاسيوم فى ٢٥٠ مل مــاء مقطر أحتفظ بـ١٠مل من هذا المحلول . أضف إلى الجزء الرئيسى من المحلول السابق بالتدريج محلول مشبع مـبرد من كلوريد الزئبق مع التقليب المستمر حتى يتكون راسـب دائم . أضف محلول يوديد البوتاسيوم (١٠مل المحتفظ بها) وكميات أضــافيه من كلوريد الزئبق حتى يتكـون راسـب أحمر فاتح .

أذب ١٥٠جرام من ايدرو أكسيد البوتاسـيوم فـى ١٥٠مـل ماء مقطر. برد المحلول ثم يضاف إلى المحلول السابق . خفف إلى أن يصل الحجم إلى لتر بالماء المقطـر . أتـرك المحلول لمدة أسبوع وخذ الرائق للأستعمال .

يود مركز

يود	١٥	جرام
يوديد بوتاسيوم	٧٥	جرام
ماء مقطر	٢٢٥	مل

اصحن اليود و يوديد البوتاسيوم في هاون ثم يذاب في الماء . يحفظ المحلول في زجاجات ملونة .

المراجع

أبو الدهب (مصطفى كمال) ١٩٦٥ – البكتيريا – دار المعارف(٧٣٣ صفحة)

سليم (محمود) ، طه(صلاح الدين)– ١٩٥٣ – البكتيرويولوجيا العلمية .الطبعة الثانية – مطبعة العلوم بالقاهرة (١٧٤ صفحة) .

شحاتة (أحمد محمد التابعي)، عبد الغفار(أحمد صبرى)، أبو الدهب (مصطفى كمال) ، الراكشي (سعد الدين) – ١٩٦٢ – الأساسيات العلمية في علوم الأحياء الدقيقة • عام وتطبيقي– دار المعارف بمصر (٣١٠ صفحة).

فكرى(محمد عزيز) – ١٩٦٩ – الميكروسكوب ، استعماله في الفحص البيولوجي – الهيئة العامة للكتب والأجهزة العلمية (٢٤٧ صفحة) .

Baker , F. J 1662 . Handbook of Bacteriological Technique . Butterworths ,London 369p.

Blendon , D C. and H.S. Goldberg . 1995. Silver impregnation stain for l*eptospira* and flagella . J. Bact. 89: 899-900 .

Braun, W.1953. Bacterial Genetics, W.B . Saunders Company . Philadelphia - London 288p

Clifton, C E. 1958. Introduction to the Bacteria. Mc. Graw- Hill Book Company, Inc.New York, Toronto, London .558p.

Collins, C.H. and C.E.D. Taylor. 1969. Microbiological Methods. 2nd Ed. Butterworths, London. 404p.

Cruickshank, R. 1960. Mackie &McCartneyls Handbook of Bacteriology Tenth Edition. E. & s. Livingston Limited Edinburgh and London. 980p.

De Vay, JE. and W.C Schnathorst. 1963. Single cell isolation and preservation of bacterial cultures. Nature 199 : 775-777 .

Dixon, M.and E.C. Webe 1967. Enzymes. 2nd Ed. Longmans 950. p. 56 : 815 - 849

Hunwicke. 1931. The Essentials of Bacteriological Technique. Williams and Norgate. LTD. 108 p.

Johansen D.A. 1940. Plant Microtechnique. Mc Graw Hill Book Company. New York and London, 523 p.

Johnson. L.F. , E.A. , Curl, S.H. Bond, and H.A. Fribourg , 1960. Methods for Studying Soil Microflora - Plant Disease Relation ships . Burgess Publishing Company. Minneapolis 15 , Minn. 178 p.

Kleiner ; I.S. and J.M. Orten. 1962. Biochemistry. Sixth Ed. The C.V. Mosby Company. St. Louis, 867 p.

Lord, T.H. 1959. Determinative Bacteriology - Laboratory Manual. Burgess Publishing Co, Minneapolis 15-Minn 84 p.

Mackie, T.S. and J.E. McCartney. 1945. Handbook of Practical Bacteriology. Seventh Ed. E. and S. Livingston, L.T.D. Edinburgh.

Pelczar, M.J.(J.R.,) P.A.Hansen, and W.A. Konetzka. 1955. Quantitative Bacterial Physiology, Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15-Minn,149 p.

Salle , A.J. 1948, Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology , Third Edition Mc Graw - hill Book Company. New York - Toronto - London 176. p.

Publishing Co. Minnesota. 246 p.

Schoenhard, D.E. 1962. Basic Conceptes and Experiments in Microbiology Burgess

Slack, J.M., J.E. Dyson, and W.K. Harrell. 1960. Experimental Pathogenic Microbiology. Burgess Publishing Company., Minneapolis 15, Minn. 146p.

Society of The American Bactriologists. Committee on Bacteriological Technique. 1946. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Geneva, N. Y. Loose Leaf .

Stanier,R.Y., M. Doudoroff and E.A. Adelberg. 1972. General Microbiology. Third edition. The Macmillan, London, N.Y.873.

Sykes, G. 1958. Disinfection and Sterilization. E. and F.N. Spon. Ltd London. 393. p.

Thimann, K.V. 1961 The Life of Bacteria. The Macmillan Company, New York.775 p.

United States Department of Agriculture. 1965 Proceedings of the Fisrst Workshop on Phytobacteriology . University of Missouri. Columbia, Missouri. 91. p.

Wedberg. S.E. 1966 . Introduction to Microbiology. Reinhold Publishing Corporation, New York . 426. p.

Wilson, G.S. and A.A. Miles. 1964 Toply and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. V.olume I.Fifth Edition, Edward Arnold (Pubgishers) LTD. London, 1191 p.

طبع بمطابع دار المعارف

البكتيرات كائنات حية دقيقة غالبيتها مفيد للإنسان والقليل منها ضار يسبب أمراضا تهدد حياة الإنسان والحيوان والنبات وهى تعيش ملازمة للكائنات الأكثر رقيا، ولم تكتشف إلا فى بداية القرن السابع عشر عند اكتشاف الميكروسكوب.

وهذه الكائنات تعيش فى مجاميع شأنها شأن الكائنات الحية الأخرى، فهى تخضع لقوانين المجتمعات، وخاصة المنحنى الطبيعى للنمو. وكانت البكتيرات أول كائنات استعملت فى التجارب الخاصة بالجينات الوراثية التى عزل منها الكروموسوم بأكمله أو أجزاء منه أو مكوناته من خلية إلى أخرى للحصول على تركيبات وراثية جديدة، وعلى ضوء هذه النتائج وضعت مبادئ ماهو معروف الآن بالهندسة الوراثية.

ويشتمل الجزء الأول من هذا الكتاب على دراسات مفصلة عن شتى نواحى علم البكتيرات كما أنه يحتوى على أحدث النتائج وأحدث نظم تقسيم وتصنيف البكتيرات.

أما الجزء الثانى فقد اشتمل على الاختبارات الأساسية التى تتطلبها دراسة هذا العلم تطبيقا لما جاء فى الجزء الأول من نظريات ومعلومات، كما اشتمل على اختبارات متخصصة فى المجالات التطبيقية المختلفة من هذا العلم.



دار المعارف

١٠٥٤٠٧/٠٢



